

Aus der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie  
der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

# **Organveränderungen unter extrakorporaler Kreislaufunterstützung**

## **Habilitationsschrift**

zur

Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae habilitatus (Dr. med. habil.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Vorgelegt von

Dr. med. Christian Alfons Skrabal

geb. am 14.03.1969 in Regensburg

Rostock, den 23.07.2007

**urn:nbn:de:gbv:28-diss2008-0031-3**

## **Gutachter**

<b>Titel, akad. Grad</b>	<b>Vorname, Name</b>	<b>Institution</b>
Prof. Dr.	Andreas Liebold	Klinik für Herzchirurgie Universitätsklinikum Rostock Schillingallee 35, 18057 Rostock
Prof. Dr.	Nikolaus Mender	Deutsches Herzzentrum München Klinik an der Technischen Universität München Lazarettstrasse 36, 80636 München
Prof. Dr.	Axel Laczkovics	Klinik für Herz- und Thoraxchirurgie BG-Universitätsklinikum Bergmannsheil Bürkle-de-la-Camp-Platz 1, 44789 Bochum

## **Tag der Verteidigung**

**31.03.2008**

**Meiner Tochter**

**Anna Zoé**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1. Geschichte der extrakorporalen Zirkulation.....	7
1.2. Arten der extrakorporalen Zirkulation.....	8
1.2.1. Der kardiopulmonale Bypass bei herzchirurgischen Standardeingriffen .....	8
1.2.2. Mechanische Kreislaufunterstützung als temporärer oder permanenter Herzersatz .....	9
1.2.2.1. Extrakorporale Membranoxygenierung.....	9
1.2.2.2. Ventricular Assist Device.....	9
1.3. Fragestellung .....	10
2. Organveränderungen unter extrakorporaler Zirkulation - Beobachtungen an der Herz-Lungen-Maschine .....	11
2.1. Minimierung des Herz-Lungen-Maschinen-Konzepts verringert die Myokardschädigung bei herzchirurgischen Eingriffen (Asaio J. 2007;53:32-5) .....	11
2.1.1. Einleitung.....	11
2.1.2. Methodik .....	12
2.1.2.1. Anästhesie .....	12
2.1.2.2. Operation .....	12
2.1.2.3. Proben und Parameter.....	13
2.1.2.4. Statistik.....	13
2.1.3. Ergebnisse.....	13
2.1.3.1. Hämodilution.....	14
2.1.3.2. Myokardmarker.....	14
2.1.4. Diskussion.....	14
2.2. Endothelschädigung während extrakorporaler Zirkulation – Welchen Einfluss hat eine Minimierung der Herz-Lungen-Maschine? (J Thorac Cardiovasc Surg. 2006;132:291-6) .....	16
2.2.1. Einleitung.....	16
2.2.2. Methodik .....	17
2.2.2.1. Anästhesie und Operation .....	17
2.2.2.2. Proben und Parameter.....	17
2.2.2.3. Zirkulierende Endothelzellen (CEC) .....	18
2.2.2.4. Statistik .....	18
2.2.3. Ergebnisse.....	19
2.2.3.1. Zirkulierende Endothelzellen (CEC) .....	19
2.2.3.2. Von Willebrand Faktor Antigen (vWF:Ag).....	19
2.2.3.3. Lösliches Thrombomodulin (sTm) .....	20
2.2.4. Diskussion.....	20

3. Organveränderungen unter extrakorporaler Zirkulation – Beobachtungen an ventrikulären Unterstützungssystemen.....	22
3.1. BNP und ET-1 korrelieren mit der Funktion und Morphologie des linken Ventrikels bei LVAD-Patienten (J Surg Res. 2005;123:25-32).....	22
3.1.1. Einleitung.....	22
3.1.2. Methodik.....	22
3.1.2.1. Patienten.....	22
3.1.2.2. Echokardiographie.....	23
3.1.2.3. BNP und ET-1 Bestimmung.....	23
3.1.2.4. Histologische Gewebeanalyse.....	23
3.1.2.5. Statistik.....	24
3.1.3. Ergebnisse.....	24
3.1.3.1. Echokardiographische Ergebnisse.....	24
3.1.3.2. BNP und ET-1 im Plasma.....	25
3.1.3.3. Systemabhängige Veränderungen.....	25
3.1.4. Diskussion.....	25
3.2. Mastzellen und deren Mediatoren beim myokardialen Re-Modeling unter mechanischer linksventrikulärer Unterstützung (J Heart Lung Transplant. 2004;23:709-15).....	26
3.2.1. Einleitung.....	26
3.2.2. Material und Methodik.....	27
3.2.2.1. Patienten.....	27
3.2.2.2. Mastzellbestimmung.....	27
3.2.2.3. Kollagengehalt.....	28
3.2.2.4. Basic Fibroblast Growth factor (bFGF).....	28
3.2.2.5. Fluoreszenz-Mikroskopie von Mastzellen und bFGF.....	28
3.2.2.6. Statistik.....	29
3.2.3. Ergebnisse.....	29
3.2.3.1. Mastzellen im Myokard.....	29
3.2.3.2. Basic Fibroblast Growth factor (bFGF).....	30
3.2.4. Diskussion.....	30
3.3. Interaktion zwischen myokardialen Mastzellen und kultivierten Fibroblasten (J Surg Res. 2004;118:66-70).....	31
3.3.1. Einleitung.....	31
3.3.2. Material und Methodik.....	31
3.3.2.1. Isolation myokardialer Mastzellen.....	31
3.3.2.2. Kollagenproduktion.....	32
3.3.2.3. Heat-Shock-Protein-47 (HSP-47).....	32

3.3.2.4.	Statistik .....	32
3.3.3.	Ergebnisse .....	33
3.3.3.1.	Mastzell-/Fibroblasten-Zellkultur .....	33
3.3.3.2.	HSP-47-Gehalt im Myokard .....	33
3.3.4.	Diskussion .....	33
4.	Diskussion .....	35
4.1.	Die Pathologie der Herz-Lungen-Maschine bei kardiochirurgischen Standardeingriffen .....	35
4.2.	Kardiale Veränderungen während mittel- bis langfristiger mechanischer Entlastung mittels linksventrikulärem Assist Device .....	37
4.3.	Zusammenfassung der übergreifenden Effekte von HLM und VAD und Ansätze zu deren Modifikation .....	38
5.	Referenzen .....	39
6.	Abkürzungen .....	49

#### Anhang:

#### I. Publikationen

- Publikation 1: Skrabal CA, Steinhoff G, Liebold A. Minimizing cardiopulmonary bypass attenuates myocardial damage after cardiac surgery. Asaio J. 2007;53:32-5.
- Publikation 2: Skrabal CA, Choi YH, Kaminski A, Steiner M, Kundt G, Steinhoff G, Liebold A. Circulating endothelial cells demonstrate an attenuation of endothelial damage by minimizing the extracorporeal circulation. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006;132:291-6.
- Publikation 3: Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, Lafuente JA, Roberts RR, Akgul A, et al. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. J Surg Res. 2005;123:25-32.
- Publikation 4: Akgul A, Skrabal CA, Thompson LO, Loebe M, Lafuente JA, Noon GP, et al. Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support. J Heart Lung Transplant. 2004;23:709-15.
- Publikation 5: Skrabal CA, Thompson LO, Southard RE, Joyce DL, Noon GP, Loebe M, et al. Interaction between isolated human myocardial mast cells and cultured fibroblasts. J Surg Res. 2004;118:66-70.

#### II. Selbständigkeitserklärung

#### III. Curriculum Vitae

#### IV. Danksagung

# **1. Einleitung**

## **1.1. Geschichte der extrakorporalen Zirkulation**

Die historische Entwicklung der extrakorporalen Zirkulation begann mit isolierten Organperfusionen in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Karl Eduard Loebell untersuchte 1849 mittels künstlicher Durchblutung einer explantierten Niere die Harnsekretion und den Sekretionsdruck im Ureter in Abhängigkeit vom Blutfluss (1). 1885 beschrieben Max von Frey und Max Gruber den ersten geschlossenen extrakorporalen Kreislauf, welcher bereits mit Thermometer, Luftfallen, Druckmessungen und dem ersten Film-oxygenator ausgestattet war (2). Es sollte trotzdem noch fast 70 Jahre dauern, ehe die erste erfolgreiche Operation am offenen Herzen unter Zuhilfenahme einer aus heutiger Sicht als Ur-Herz-Lungen-Maschine zu bezeichnenden Apparatur gelang: Dr. John Gibbon hatte am 6. Mai 1953 einen großen Vorhofseptumdefekt bei einem 18-jährigen Mädchen verschlossen und setzte damit einen Meilenstein in der modernen Herzchirurgie (3). Die Folgezeit war geprägt von zahlreichen, meist technisch bedingten Tiefschlägen, so dass, angetrieben durch den Pioniergeist der damaligen Zeit, alternative Methoden der extrakorporalen Zirkulation entwickelt wurden. Allen voran ist Dr. C. Walton Lillehei's „Cross-Circulation“-Technik zu nennen. Hierbei dienten Herz und Lunge eines Elternteils dem zu operierenden, kindlichen Patienten als Pumpe und Oxygenator. Lillehei hat so in den Jahren 1954/1955 bei 45 Kindern zum Teil komplexe intrakardiale Fehlbildungen korrigiert (4). Nicht zuletzt aufgrund ethischer Bedenken der Kollegen begann auch Lillehei, trotz guter Ergebnisse, zunehmend ein künstliches Oxygenationssystem zu nutzen, dessen Kernstück ein von Dr. Richard DeWall und ihm entwickelter Bubbleoxygenator war (5, 6).

In etwa zur selben Zeit hat Dr. John Kirklin seine beeindruckende und erfolgreiche Serie von Herzoperationen an der Mayo-Klinik in Rochester unter Verwendung einer modifizierten „Gibbon-Maschine“ gestartet. Kirklin hat mit seiner Erfahrung und mit zahlreichen Studien dazu beigetragen, die Herz-Lungen-Maschine in der letzten Phase der Entwicklung entscheidend zu verbessern und deren Handhabung für den Routinebetrieb zu vereinfachen (7-10). Auch außerhalb der USA hat man sich intensiv mit der (Weiter-) Entwicklung der HLM beschäftigt. So bereiteten beispielsweise die Arbeitsgruppen um Dr. Emil Bücherl und Dr. Rudolf Zenker mit ihren Konstruktionen und Experimenten den Weg für die ersten erfolgreichen Herzoperationen in Deutschland Ende der 1950iger Jahre (11-13).

Unter dem Schutz der extrakorporalen Zirkulation war die Korrektur von immer komplexeren Herzfehlern möglich. Einzig die Therapie der Pumpschwäche, die aufgrund einer Dilatation der Herzhöhlen oder einer schweren Ischämie resultierte, blieb dem operativen Vorgehen verwehrt. Schnell war klar, dass ein möglicher Ausweg der Austausch des insuffizienten Herzens durch ein neues, biologisches Herz oder durch eine mechanische Pumpe ist.

So ist es wohl auch nicht verwunderlich, dass die Entwicklung artifizierlicher Blutpumpen, welche partiell oder komplett die Funktion des Herzens übernehmen, parallel zu experimentellen Arbeiten für die Herztransplantation begann. Erstmals kam 1963 am Baylor College of Medicine in Houston, Texas ein pneumatisch betriebener linksventrikulärer Bypass bei einem Menschen zum Einsatz, und 1966 implantierte Dr. Michael E. DeBakey einer Patientin eine Pumpe, die temporär die linke Herzkammer unterstützte (14-16). 1969 wurde erstmals durch Dr. Denton Cooley einem Patienten ein komplett implantierbares, pneumatisch betriebenes Kunstherz eingesetzt, welches für 64 Stunden die Perfusion übernahm, ehe die Herztransplantation durchgeführt wurde (17).

Heute werden mechanische Unterstützungssysteme weiterhin als Überbrückung zur Transplantation (bridge to transplant), aber auch als Überbrückung bis zur Erholung des geschädigten Herzens (bridge to recovery) oder gar als Alternative zur Herztransplantation (alternative to transplant, destination therapy) implantiert.

## 1.2. Arten der extrakorporalen Zirkulation

Die verschiedenen Formen der extrakorporalen Zirkulation ergeben sich aus dem jeweiligen Bedarf an Kreislaufunterstützung: Wird eine kurz-, mittel- oder langfristige Unterstützung mit oder ohne Oxygenierungsmöglichkeit benötigt?

### 1.2.1. Der kardiopulmonale Bypass bei herzchirurgischen Standardeingriffen

Die Herz-Lungen-Maschine (HLM) wird heute täglich in Tausenden Operationssälen weltweit eingesetzt, um bei Eingriffen am kardioplegischen Herzen kurzfristig eine vollständige Kreislaufunterstützung, Oxygenierung und Regulierung der Körpertemperatur zu ermöglichen. In der Standard-HLM-Konstellation wird das venöse Blut über eine Kanüle im rechten Vorhof und dem damit verbundenen Schlauchsystem der Schwerkraft folgend in das Kardiotomiereservoir geleitet, in welches auch der sogenannte Kardiotomiesauger das Blut aus dem Operationssitus drainiert. Das Blut wird entschäumt und über einen Partikelfilter gereinigt, ehe es via Rollpumpe zum Oxygenator befördert wird. Über eine semipermeable Membran erfolgt unter Sauerstoffzufuhr der Gasaustausch sowie über den in modernen Systemen integrierten Wärmetauscher die Regulierung der Körpertemperatur, bevor das Blut durch einen fakultativen arteriellen Blutfilter in die Aorta ascendens gepumpt wird. Trotz ständiger Bemühungen zur Verbesserung der Oberflächen-Biokompatibilität ist eine effiziente Antikoagulation mit Heparin während der gesamten extrakorporalen Zirkulation weiterhin unumgänglich.



## **1.2.2. Mechanische Kreislaufunterstützung als temporärer oder permanenter Herzersatz**

### **1.2.2.1. Extrakorporale Membranoxygenierung**

Die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) gleicht in ihrer Technik der Herz-Lungen-Maschine und wird entsprechend der kanülierten Gefäßsysteme und der daraus sich ergebenden Kreisläufe in veno-venöse ECMO (VV-ECMO) und veno-arterielle ECMO (VA-ECMO) unterteilt. Entnommen wird das Blut aus großen Venen. Bei der VV-ECMO wird das oxygenierte Blut dann wieder einer Vene zugeführt und ist bei schwerem Lungenversagen mit noch ausreichender Funktion des Herzens indiziert. Bei der AV-ECMO hingegen wird das Blut am Herzen vorbei in eine Arterie geleitet. Der so entstehende Parallelkreislauf entlastet das Herz und empfiehlt sich zur Oxygenierung bei gleichzeitig bestehender kardialer Pumpinsuffizienz. Obwohl geeignet für den Einsatz bei Kindern und Erwachsenen, begrenzt sich die Indikation für die ECMO heutzutage in der Behandlung Neugeborener mit therapieresistenter respiratorischer Insuffizienz und von Kindern mit angeborenen Herzfehlern hauptsächlich nach operativen Korrekturingriffen zur kurz- bis mittelfristigen (1-30 Tage) Kreislaufunterstützung (18).

### **1.2.2.2. Ventricular Assist Device**

Für den mittel- und langfristigen Support stehen „Kunstherzen“, sogenannte Ventricular Assist Devices (VAD) zur Verfügung, die je nach Bedarf selektiv die Funktion einer oder beider Herzkammern übernehmen. Es handelt sich hierbei um reine Pumpsysteme ohne Oxygenierungseinheit, weshalb der Einsatz eines VAD die Funktionalität der Lungen voraussetzt. Man unterscheidet vollimplantierbare von parakorporalen, sowie entsprechend ihrer Funktionalität links-, rechts- und biventrikuläre Assist Devices (LVAD, RVAD, BiVAD). Ist Letzteres vollimplantierbar, spricht man vom „Total Artificial Heart“ (TAH).

Die VADs gruppieren sich als pulsatile und nonpulsatile Systeme. Pulsatil heißt hier, dass analog zum Herzen rhythmisch Volumen vom künstlichen Ventrikel ausgeworfen wird und daher im Kreislauf ein systolischer und diastolischer Druck messbar werden. Die Pumpeinheiten bestehen aus einem flexiblen Kunststoffsack in einer rigiden Kammer und einer meist pneumatischen Kompressorvorrichtung, die es erlaubt, die Druckwerte in dieser Kammer (pulsatil) zu verändern, und so das Füllen und Entleeren des Kunststoffsackes mit Blut ermöglicht. Ein unidirektionaler Blutfluss wird über Ein- und Auslassklappen (biologisch oder mechanisch) gewährleistet.

Nonpulsatile Systeme sind turbinenähnliche Konstruktionen (Impeller-, Axialpumpen), die einen überwiegend laminären Fluss erzeugen. Ihre geringe Größe macht diese Axial- oder Impellerpumpen voll implantierbar, begrenzt aber deren Einsatzmöglichkeit momentan noch auf die Unterstützung des linken Ventrikels. Der unidirektionale Fluss wird ohne Klappen erreicht, was jedoch im Falle eines

Funktionsausfalles das kranke Herz zusätzlich durch eine funktionelle Aortenklappeninsuffizienz belastet. Die initialen Bedenken, der unphysiologische, annähernd nonpulsatile Fluss könne zu Organdysfunktionen führen, haben sich bisher auch im Langzeitverlauf nicht bestätigt (19). Überdies kommt es häufig durch die verbliebene Herzfunktion zum orthograden Volumenauswurf, der so zu einer gewissen Pulsatilität führt. Die schnelle und weite Verbreitung dieser Axialpumpen ist nicht zuletzt durch den geringeren Energiebedarf und die dadurch einfachere Energiebereitstellung zu erklären, was den Patienten, nach ersten Eindrücken, den Umgang mit dem künstlichen Herzen erleichtert.

Ungeachtet ihres fundamentalen Beitrags zur Behandlung von Herzerkrankungen, induzieren sowohl HLM als auch VAD typische pathophysiologische Veränderungen im Gesamtorganismus, die in der Vergangenheit oft als Ganzkörperentzündung (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) bezeichnet wurden (20-25). Inwieweit diese pathophysiologischen Veränderungen tatsächlich zu manifesten Organschäden führen können, hängt wesentlich von der Konfiguration der extrakorporalen Zirkulation, ihrer Betriebsdauer und dem Ausmaß der Organvorschädigung des individuellen Patienten ab.

### **1.3. Fragestellung**

Ziel dieser Habilitationsschrift ist die nähere Charakterisierung einzelner Teilaspekte der EKZ und ihrer Auswirkungen auf den Organismus.

Teil 1 beschäftigt sich mit den unmittelbaren Folgen des Kontaktes körpereigener Substanzen mit den künstlichen Oberflächen der HLM bei herzchirurgischen Operationen:

- Hat die HLM Einfluss auf die perioperative Myokardschädigung?
- Triggert die HLM eine Endothelzellaktivierung?
- Lassen sich die beobachteten pathophysiologischen Veränderungen durch Modifikation des klassischen HLM-Konzeptes beeinflussen?

Im Teil 2 werden die pathophysiologischen Auswirkungen der prolongierten maschinellen Kreislaufunterstützung in Form des VAD auf das Herz untersucht:

- Welchen Einfluss hat die mechanische ventrikuläre Entlastung auf die Funktionalität und die Morphologie des terminal insuffizienten Myokards?
- Gibt es auf zellulärer Ebene Erklärungen für das „reverse Remodeling“?
- Hat die Mastzelle direkten Einfluss auf die Kollagenanreicherung im geschädigten Herzen?

## **2. Organveränderungen unter extrakorporaler Zirkulation – Beobachtungen an der Herz-Lungen-Maschine**

### **2.1. Minimierung des Herz-Lungen-Maschinen-Konzepts verringert die Myokardschädigung bei herzchirurgischen Eingriffen**

#### **2.1.1. Einleitung**

Seit dem ersten erfolgreichen Einsatz im Jahre 1956 durch Dr. John Gibbon haben zahlreiche technische Innovationen die Herz-Lungen-Maschine zu einem sicheren, zuverlässigen und leistungsfähigen Instrument in Tausenden Operationssälen weltweit gemacht (3). Problematisch bleibt der Kontakt von Blutkomponenten mit den Kunststoffoberflächen, der, trotz zahlreicher neuer Beschichtungsverfahren zur Steigerung der Biokompatibilität, hauptverantwortlich gemacht wird für eine den ganzen Körper betreffende Entzündungsreaktion, das systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (20-25). Als weitere Ursachen des SIRS müssen in diesem Zusammenhang die Ischämie und Reperfusion während und nach Aortenklammung, die Endotoxinämie als Folge eventueller intestinaler Hypoperfusion sowie die Operation selbst angeführt werden. Es folgen Aktivierung des Komplementsystems, der Koagulationskaskaden und Fibrinolyse, sowie die zelluläre Aktivierung von Thrombozyten, Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten und Endothelzellen. Das Ausmaß dieser Reaktionen hängt ab von der Oberfläche der Biomaterialien, der Perfusionsdauer, der Temperatur, dem Blut-Wund-Kontakt und nicht zuletzt von intraindividuellen Patientenfaktoren (26-31).

Ein weiterer Problempunkt ist die reduzierte Sauerstoffbereitstellung (delivery of oxygen,  $DO_2$ ) unter HLM-Bedingungen. Obwohl der Gesamtfluss während der EKZ annähernd dem eines normalen Herz-Zeit-Volumens entspricht, geht die systembedingte etwa 25% bis 40%ige Verringerung der Hämoglobinkonzentration mit einer ebensolchen Verringerung der  $DO_2$  einher (32, 33). Mit Hypothermie wird versucht, dem verringerten Sauerstoffangebot mit einem geringeren Sauerstoffbedarf zu begegnen. Trotzdem haben neuere Studien ergeben, dass unter HLM-Bedingungen der regionale Blutfluss und somit das Sauerstoffangebot in allen Organsystemen sinken (34).

Neue minimierte Herz-Lungen-Maschinen-Konzepte, sog. Mini-HLM, könnten hier eine interessante Alternative darstellen. Eines dieser Mini-Systeme, das MECC-System (minimal extracorporeal circuit), befindet sich bereits in unserer Klinik im Einsatz. Leitprinzip bei der Entwicklung dieses Systems war die konsequente Reduktion von Fremdoberflächen. Im Gegensatz zu konventionellen HLM-Systemen handelt es sich beim MECC-System um ein geschlossenes System ohne Blut-Luft-Kontakt. Es entfallen arterieller Blutfilter, Kardiotomiereservoir und Maschinensauger. Dadurch wird nicht nur die

Fremdoberfläche, sondern auch das zum Füllen des Systems notwendige Primingvolumen von etwa 1500 ml auf 500 ml reduziert. Die Rollenpumpe weicht im MECC-System einer Zentrifugalpumpe.

In dieser prospektiv randomisierten Studie haben wir den klinischen Einsatz von konventionellen und minimierten Herz-Lungen-Maschinen bei der aortokoronaren Bypass-OP im Hinblick auf die perioperative Myokardschädigung und Hämodilution untersucht.

### **2.1.2. Methodik**

Sechzig Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Indikation zur operativen Revaskularisation wurden prospektiv randomisiert entsprechend der zum Einsatz kommenden Herz-Lungen-Maschine auf 2 Gruppen verteilt. In der Standard-HLM kommen ein mikroporöser Membranoxygenator (Jostra Quadrox, Maquet Cardiopulmonary AG, Deutschland), ein Hartschalen-Kardiotomiereservoir mit entsprechender Saugvorrichtung, sowie eine Rollenpumpe (Jostra HL 20, Maquet Cardiopulmonary AG, Deutschland) zum Einsatz. Das MECC-System besteht aus einem neuartigen plasmadichten Diffusionsmembranoxygenator (Jostra Quadrox D, Maquet Cardiopulmonary AG, Deutschland), einer Zentrifugalpumpe (Jostra RotaFlow, Maquet Cardiopulmonary AG, Deutschland) und zu- und abführenden Schlauchsystemen, während ein Kardiotomiereservoir mit entsprechendem Sauger sowie assoziierte Schlauchkomponenten fehlen. Blut aus dem OP-Situs wird hier zunächst über ein Cellsaver-Device aufgenommen und nur bei Bedarf dem Patienten retransfundiert. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Primingvolumina, die zur Vorfüllung der HLM notwendig sind. Während die Standard-HLM mit 1000 ml kolloidaler und 500 ml kristalloider Lösung gefüllt wird, sind es im MECC-System nur 500 ml kristalloide Vollelektrolytlösung. Beide Systeme ermöglichen eine Flussunterstützung von 2,0 – 2,5 l/min/m<sup>2</sup> Körperoberfläche.

#### **2.1.2.1. Anästhesie**

Die Anästhesie wurde mit 1 µg/kg Sufentanyl, 0,2 mg/kg Etomidat, 0,04 mg/kg Midazolam und 0,15 mg/kg Cisatracurium eingeleitet und mit 1 µg/kg/h Sufentanyl und 0,1 mg/kg/h Midazolam aufrecht erhalten; volatile Anästhetika kamen nur bis zum Beginn des kardiopulmonalen Bypasses zum Einsatz. Alle Patienten wurden mit einem Endotrachealtubus intubiert und erhielten einen zentralen Venenkatheter, einen Arterienkatheter und einen Blasenkatheter.

#### **2.1.2.2. Operation**

Nach medianer Sternotomie erfolgt die Präparation der Bypassgrafts, der Arteria thoracica interna sinistra und der Vena saphena magna. Vor Anschluss der HLM wird zur systemischen Antikoagulation

Heparin (200 – 300 IU/kg) intravenös verabreicht, wobei beim Standard-System eine activated clotting time (ACT) von 400 Sekunden und beim MECC-System eine ACT von 250 Sekunden angestrebt wird. Beide Systeme werden in gleicher Weise über Kanülierung der Aorta ascendens und des rechten Vorhofes via venöse Zwei-Stufen-Kanüle angeschlossen. Nach Beginn des kardiopulmonalen Bypasses wird eine milde Hypothermie von 31°C – 32,5°C etabliert.  $1 \times 10^6$  IU Aprotinin wird in die Priminglösung, weitere  $1 \times 10^6$  IU/h während der EKZ-Zeit verabreicht. Die Koronaranastomosen werden unter Aortenabklemmung, die proximalen Venenanastomosen unter partieller Ausklemmung der Aorta ascendens angefertigt. Nach Beendigung der EKZ wird Heparin mit Protamin (1 mg / 100 IU Heparin) antagonisiert.

#### 2.1.2.3. Proben und Parameter

Die Analyse der hämorrheologischen Parameter, Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hkt), und der kardialen Parameter, Creatinkinase Isoenzym MB (CKMB) und Troponin T (TnT), erfolgte präoperativ sowie 6, 12 und 24 Stunden nach EKZ-Beginn. CKMB und Troponin T wurden mittels Elektrolumineszenz-Technik (Elecsys 2010, Roche) bestimmt. Alle Werte wurden Hämatokrit-korrigiert.

#### 2.1.2.4. Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler präsentiert. Normalverteilung wurde mit dem Verfahren nach Kolmogorov-Smirnov geprüft. Der zweiseitige Student's t-Test für abhängige Proben wurde verwendet, um die jeweiligen Werte eines Patienten zu analysieren, für unabhängige Proben, um Werte zwischen den Gruppen zu vergleichen. Nicht-parametrische Tests wurden für nicht-normalverteilte Daten herangezogen. Hierbei wurden Unterschiede zwischen den Gruppen in korrespondierenden Messungen mittels Mann-Whitney U-Test analysiert, während für die Werte eines jeweiligen Patienten der Wilcoxon-Test für gepaarte Proben verwendet wurde. Alle Berechnungen und Analysen wurden unter Verwendung von SPSS Version 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) für ein Signifikanzniveau  $p < 0,05$  durchgeführt.

### 2.1.3. Ergebnisse

Die demographischen und perioperativen Daten sind in Tabelle 1 aufgelistet. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich Alters, Körperoberfläche, präoperativer Ejektionsfraktion, Aortenabklemmzeit, EKZ-Dauer, Anzahl der Bypässe, Bedarf an inotroper Therapie sowie intensivstationären Aufenthalts. Die perioperative Mortalität betrug 0% und alle Patienten hatten einen unkomplizierten postoperativen Verlauf. Interessanterweise war der Blutverlust innerhalb der ersten 24 Stunden in der Standard-HLM-Gruppe höher als in der MECC-Gruppe ( $p < 0,05$ ).

Tabelle 1: Perioperative Patientendaten

Kriterium	Standard-HLM	MECC	P-Wert
Anzahl (n)	30	30	
Alter (Jahre)	63,8 ± 1,7	65,8 ± 2,2	0,487
Körperoberfläche (m <sup>2</sup> )	2,00 ± 0,04	1,91 ± 0,03	0,077
Präoperative EF (%)	63,1 ± 2,8	57,0 ± 3,5	0,180
Bypässe (n)	3,8 ± 0,15	3,6 ± 0,15	0,439
EKZ-Zeit (min)	92,1 ± 4,3	85,5 ± 3,4	0,234
24-h Blutverlust (ml)	327 ± 46	222 ± 23	0,048
ITS-Verweildauer (Tage)	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,07	0,304

#### 2.1.3.1. Hämodilution

Der präoperative Hämatokrit in der Standard-HLM-Gruppe war signifikant höher als in der MECC-Gruppe ( $41\% \pm 0,5$  vs.  $39\% \pm 0,7$ ;  $p < 0,005$ ). Während der EKZ fiel der Hämatokrit in beiden Gruppen verglichen zu den Ausgangswerten ( $p < 0,0001$ ). Unmittelbar postoperativ war die Hämodilution in der MECC-Gruppe mit einem Hämatokritabfall von  $8,9\% \pm 0,6$  signifikant geringer als in der Standard-HLM-Gruppe mit  $11,3\% \pm 0,5$  ( $p < 0,005$ ). Auch nach 12 und 24 Stunden war der Hämatokritabfall nach Einsatz des MECC-Systems geringer:  $6,9\% \pm 0,6$  vs.  $9,8\% \pm 0,6$  ( $p < 0,002$ ) bzw.  $7,9\% \pm 0,5$  vs.  $10,6\% \pm 0,6$  ( $p < 0,002$ ).

#### 2.1.3.2. Myokardmarker

Die postoperativen Werte für Troponin T (ng/ml) waren im Verlauf nach 6, 12 und 24 Stunden in der MECC-Gruppe jeweils signifikant niedriger als in der Standard-HLM-Gruppe ( $0,07 \pm 0,01$  vs.  $0,16 \pm 0,04$ ,  $p < 0,005$ ;  $0,12 \pm 0,03$  vs.  $0,28 \pm 0,08$ ,  $p < 0,008$ ;  $0,21 \pm 0,05$  vs.  $0,35 \pm 0,09$ ,  $p < 0,03$ ). Auch die Werte für CKMB (U/l) unterschieden sich in Abhängigkeit von der HLM deutlich: bei Einsatz der MECC waren die 6- und 12-Stunden-Werte signifikant niedriger ( $22,5 \pm 1,5$  vs.  $40,6 \pm 3,3$ ,  $p < 0,0001$ ;  $23,3 \pm 3,4$  vs.  $40,8 \pm 8,0$ ,  $p < 0,001$ ).

#### 2.1.4. Diskussion

Die extrakorporale Zirkulation führt zusammen mit dem Operationstrauma und der Ischämie/Reperfusion während und nach der Aortenabklemmung zur Aktivierung einer Vielzahl biologischer Systeme und zu Organdysfunktionen unterschiedlichen Ausmaßes. In dieser Studie haben wir die perioperative Myokardschädigung unter Verwendung zweier unterschiedlicher Herz-Lungen-

Maschinen-Systeme, einer Standard- und einer Mini-HLM, untersucht. Fromes et al. gehörten zu den Ersten, die von ihren Erfahrungen mit dem auch von uns verwendeten Mini-System, der MECC, berichteten. Ihre Bemühungen konzentrierten sich auf inflammatorische Vorgänge und sie entdeckten signifikant niedrigere Konzentrationen von IL-6, TNF- $\alpha$  und PMN-Elastase im Plasma der Patienten, die unter Einsatz des MECC-Systems operiert wurden (35). Vaislic et al. benutzten dieses Mini-System erfolgreich bei 40 Zeugen Jehovas, um den Blutverlust möglichst gering zu halten, und wiesen so auf den direkten klinischen Nutzen hin (36). In einer früheren, retrospektiven Studie wurde bereits über das seltenere Auftreten postoperativer Komplikationen einschließlich Myokardinfarzierung berichtet (37). Diesen Zusammenhang zwischen perioperativer myokardialer Schädigung und Minimierung des EKZ-Setups griffen Immer et al. in ihrer aktuellen Veröffentlichung auf (38). Sie ermittelten beim Einsatz des MECC-Systems signifikant niedrigere CKMB- und Troponin-I-Konzentrationen im Plasma ihrer Patienten. Wesentliche Unterschiede zu unserer Studie ergeben sich vor allem aus dem Kardioplegiemanagement und der technischen Ausbaustufe der Mini-HLM. Während Immer et al. im MECC-Setup kristalloide Kardioplegie einmalig und im Standard-Setup kalte Blutkardioplegie alle 20 Minuten mit einem abschließenden „hot-shot“ verabreichten, haben wir in beiden Gruppen durchweg Blutkardioplegie nach Calafiore nach dem gleichen Applikationsmodus und ohne „hot-shot“ eingesetzt. Des Weiteren haben wir weder eine Cardiosmart Saugvorrichtung noch eine Ultraschallsonde für Luft verwendet. Nichtsdestotrotz sind die Ergebnisse vergleichbar und scheinen nicht wesentlich beeinflusst von den Unterschieden im Setup. Die insgesamt höheren Werte der Myokardparameter in unseren Gruppen mögen durch die Korrektur nach Hämatokrit erklärt werden, die wir durchführten, um den Dilutionsfehler zu eliminieren.

Bowen et al. untersuchten die Organschädigung im Allgemeinen, indem sie Indikatoren für oxidativen Stress bestimmten. Die Analyse ihrer Ergebnisse bescheinigte auch hier dem MECC-System Vorteile gegenüber der Standard-HLM (39). Bevor man die Frage, warum die Mini-HLM organ- und, wie auch unsere Ergebnisse zeigen, myokardschonender ist, zu beantworten versucht, müssen beide HLM-Konzepte einschließlich des Setups erneut gegenübergestellt werden. Die demographischen und perioperativen Daten der Patienten einschließlich Chirurgen, chirurgische Techniken, Anzahl der Bypässe und EKZ-Zeiten waren in beiden Gruppen vergleichbar. Unterschiede bestanden im Gebrauch des Kardiotomiesaugers und der damit verbundenen Retransfusion von Blut aus dem OP-Situs über das venöse Kardiotomiereservoir zurück in den Kreislauf. Dieses im Operationsfeld zusammengelaufene und mit dem umliegenden Gewebe und Luft in Kontakt gekommene Blut soll die Entstehung einer unverhältnismäßigen Entzündungsreaktion unterstützen (29, 40, 41). Die Möglichkeit eines dadurch getriggerten Myokardschadens wird in Betracht gezogen (42-44). Außerdem wurden in diesem perikardialen Saugerblut selbst hohe Konzentrationen von CK und CKMB gefunden, besonders wenn die standardisiert als Bypassgraft verwendete A. thoracica interna präpariert wurde. Im Falle der Retransfusion erreichen diese Enzyme den Kreislauf und erhöhen so die systemische Konzentration (45).

Weitere Modifikationen betreffen die reduzierte Fremdoberfläche und der geringere Bedarf an Primingvolumen bei Mini-Systemen, was wiederum eine geringere Hämodilution zur Folge hat. Wie Gourlay et al. zeigen konnten, steigt die Aktivierung neutrophiler Granulozyten proportional zur Fremdoberfläche und umgekehrt proportional zum Hämatokrit (46, 47). Das Kardiotomiereservoir verstärkt diese Entzündungsreaktion darüber hinaus, nicht nur aufgrund seiner zusätzlichen Fremdoberfläche, sondern auch durch die Implementierung eines Blut-Luft-Kontaktes (48).

Letztendlich beeinflusst auch die Art der Pumpe die Homöostase des Blutes in unterschiedlichem Umfang. In Studien konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Zentrifugalpumpen anstelle von Rollenpumpen nicht nur eine geringere Hämolysen und Thrombozytenaktivierung zur Folge hat, sondern auch das postoperative Outcome der Patienten vor allem hinsichtlich neurologischer Komplikationen entscheidend verbessert (49-51).

Zusammenfassend verringert die Reduktion der Herz-Lungen-Maschine auf die wesentlichsten Bestandteile die perioperative Myokardschädigung bei der aortokoronaren Bypasschirurgie. Vor allem der Verzicht auf das Kardiotomiereservoir und die strikte Minimierung der Fremdoberflächen sind als Maßnahmen zu werten, die das Mini-System zu einer organschonenderen Alternative zur Standard-HLM machen.

## **2.2. Endothelschädigung während extrakorporaler Zirkulation – Welchen Einfluss hat eine Minimierung der Herz-Lungen-Maschine?**

### **2.2.1. Einleitung**

Der Einsatz der Herz-Lungen-Maschine bei herzchirurgischen Eingriffen hat die Aktivierung einer Vielzahl biologischer Systeme zur Folge und ist dadurch mitverantwortlich an der Entstehung postoperativer Organdysfunktion und -schädigung. Im vorangegangenen Kapitel konnten wir zeigen, dass sich das Ausmaß der perioperativen Myokardschädigung durch den Einsatz von auf das Wesentliche reduzierten Herz-Lungen-Maschinen-Systemen verringern lässt (52). Nun wollen wir untersuchen, welche Folgen der Einsatz der HLM auf das großflächigste Organ des menschlichen Körpers – auf das Endothel – hat und ob sich apparative Modifikationen auch hier auswirken.

Bisher wurde die Funktion des Endothels indirekt über die Bestimmung von von Willebrand Faktor (vWF), löslichem Thrombomodulin (sTm), löslichem E-Selectin, Gewebe-Plasminogen-Aktivatoren oder löslichem Endothelzell-Protein-C-Rezeptor gemessen. Mittlerweile hat sich eine neue direkte Methode zur Beurteilung der endothelialen Integrität etabliert: die immunomagnetische Isolation zirkulierender Endothelzellen (circulating endothelial cells, CEC) aus dem peripheren Blut. Sie beruht auf der Patho-



physiologie, dass es im Rahmen von Inflammationszuständen über direkte Neutrophileninteraktion, Zytokine und Proteasen oder durch mechanischen Stress oder aber durch veränderte Hafteigenschaften des Cadherin, Vitronectin, Fibronectin oder Integrin zum Ablösen einzelner Zellen aus dem Endothelverband kommt. Je mehr dieser Endothelzellen vom Untergrund gelöst in die Blutbahn abgegeben werden, desto größer wird der endotheliale Schaden vermutet. Unter physiologischen Bedingungen kommen in gesunden Individuen CECs in einer Konzentration von etwa 5 Zellen/ml Vollblut vor. Erhöhte Zahlen findet man unter anderem bei Sichelzellanämie, Infektionen mit Rickettsien oder Cytomegalievirus, bei verschiedenen Formen der Vasculitis oder bei Diabetes mellitus Typ II (53-55). Mutin et al. haben bei Patienten mit akutem Myokardinfarkt oder instabiler Angina pectoris ebenfalls eine hohe Anzahl Endothelzellen im Blut entdeckt (56). Es konnte gezeigt werden, dass die Menge der CECs mit dem Stadium einer Krankheit korrelieren, weshalb man diese Methode bereits einsetzt, um Behandlungserfolge bei Patienten mit Nierentransplantatabstoßung oder akuter myeloischer Leukämie zu beurteilen (57, 58).

In dieser Studie untersuchten wir das Ausmaß der perioperativen Endothelschädigung bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung in Abhängigkeit der zum Einsatz kommenden Herz-Lungen-Maschine. Als Parameter wurden neben den zirkulierenden Endothelzellen von Willebrand Faktor und lösliches Thrombomodulin bestimmt.

### **2.2.2. Methodik**

Zwanzig Patienten mit koronarer Herzerkrankung und Indikation zur operativen Revaskularisation wurden prospektiv randomisiert entweder der Standard-HLM- oder der Mini-HLM- (MECC) Gruppe zugeteilt. Die Spezifikationen der beiden Systeme wurden bereits in Kapitel 2.1.2. besprochen.

#### **2.2.2.1. Anästhesie und Operation**

Die Durchführung der Narkosen und Operationen entsprach im Wesentlichen dem geschilderten Standardvorgehen in unserer Klinik (Kapitel 2.1.2.1. / 2.1.2.2.).

#### **2.2.2.2. Proben und Parameter**

Die Analyse der Parameter erfolgte präoperativ, 30 Minuten sowie 6, 12, 24 und 48 Stunden nach EKZ-Beginn. Unmittelbar nach der Blutentnahme in Citrat-Monovetten wurden die Proben für 15 Minuten bei 3345 x g zentrifugiert (Heraeus Multifuge 1 S-R, Osterode, Deutschland). Der Überstand wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert. Die Bestimmung des von Willebrand Faktor Antigen (vWF:Ag) erfolgte immunoturbidimetrisch unter Verwendung des Dade Behring

vWF:Ag Test-Kits (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland). Die sTm-Konzentration wurde mit einem spezifischen Sandwich-ELISA Kit (human sCD141 ELISA kit, Diaclone Research, Besançon, Frankreich) ermittelt.

### 2.2.2.3. Zirkulierende Endothelzellen (CEC)

Die Blutprobe zur Bestimmung der Endothelzellzahl (EDTA-Monovette) wurde bei Sammelblutentnahmen zuletzt gewonnen, um eine Kontamination mit Endothelzellen aus dem Venenpunktionsbereich zu vermeiden. Die CEC-Auszählung erfolgte sofort oder, falls nicht möglich, nach Lagerung bei 4°C innerhalb der ersten 8 Stunden.

CEC wurden mit einem immunomagnetischen Zellseparationsverfahren aus dem Vollblut der Patienten isoliert. Hierzu verwendeten wir 4,5 µm große, gleichförmige, monodisperse, paramagnetische Polystyrolkugeln, sogenannte M-450 Dynabeads (DynaL, Hamburg, Deutschland), die mit dem anti-human-CD146 Antikörper (Biocytex, Marseilles, Frankreich) gekoppelt waren. Ein Milliliter Blut wurde mit 1 ml PBS (Phosphate-buffered Saline) und 0,1% bovinem Serumalbumin verdünnt und mit den anti-CD146 Dynabeads entsprechend den Herstellerangaben inkubiert. Die entstandenen Zell-Dynabead-Komplexe wurden in einer Magnetvorrichtung (DynaL MPC) isoliert, in 100 µl Rhodamine-markierter Ulex-Europaeus-Agglutinin-1 Lösung (UEA-1, 1:10 Dilution, Linaris Wertheim, Deutschland) für eine Stunde inkubiert und nach entsprechenden Waschvorgängen in 100 µl PBS resuspendiert. Auf einer Nageotte Zählkammer (Brand, Wertheim, Deutschland) aufgetragen, wurden die CEC unter dem Fluoreszenz-Mikroskop (Leica DMLB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung des Exzitationsfilters N2 (BP 546/12) ausgezählt. In Übereinkunft mit Anderen wurden zirkulierende Endothelzellen identifiziert als gut abgrenzbare, runde oder ovale, Rhodamine-markierte Zellen mit einer Größe von 10 – 40 µm, an denen mehr als 4 Dynabeads anhaften (59).

### 2.2.2.4. Statistik

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung präsentiert. Aufgrund der niedrigen Fallzahlen wurde auf Prüfung auf Normalverteilung verzichtet und non-parametrische Tests angewandt. Da präoperativ Werte von 3 Gruppen vorlagen, kam der Kruskal-Wallis-Test (KW-Test) und, falls notwendig, für Paarvergleiche zwischen den Gruppen der Mann-Whitney U-Test (MW-Test) inklusive Bonferroni-Korrektur zum Einsatz. Vergleiche der beiden Versuchsgruppen wurden mit dem Mann-Whitney U-Test bewertet, die Analyse der Werteentwicklung innerhalb einer Gruppe geschah mit dem Friedman-Test. Alle Berechnungen und Analysen wurden unter Verwendung von SPSS Version 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) für ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durchgeführt.

### 2.2.3. Ergebnisse

Die demographischen und perioperativen Daten sind in Tabelle 2 aufgelistet. Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich Alters, Geschlechtsverteilung, Myokardinfarkt-Anamnese, präoperativer Ejektionsfraktion, EKZ-Dauer, Anzahl der Bypässe, sowie intensivstationären Aufenthalts. Der postoperative Verlauf war bei allen Patienten unkompliziert. Nur ein Patient der Standard-HLM-Gruppe benötigte am 2. postoperativen Tag eine Fremdblutgabe (1 Erythrozytenkonzentrat); Retransfusion von Cellsaver-Blut war nicht erforderlich.

Tabelle 2: Perioperative Patientendaten

Kriterium	Standard-HLM	MECC	P-Wert
Anzahl (n)	10	10	
Alter (Jahre)	65,2 ± 9,6	67,5 ± 10,3	0,61
Geschlecht (m/w)	8/2	7/3	0,27
Präoperative EF (%)	50 ± 7,0	46 ± 15,0	0,55
Myokardinfarkt (<30 d)	4 (0)	5 (1)	0,65
EKZ-Zeit (min)	102,6 ± 24,0	90,2 ± 35,4	0,27
Bypässe (n)	3,8 ± 0,79	3,5 ± 0,85	0,42
ITS-Verweildauer (Tage)	1,1 ± 0,31	1,1 ± 0,31	0,99

#### 2.2.3.1. Zirkulierende Endothelzellen (CEC)

Präoperativ fanden sich in beiden Versuchsgruppen vergleichbar viele zirkulierende Endothelzellen (Zellen/ml Vollblut; Standard-HLM: 17,8 ± 3,9, MECC: 19,3 ± 7,1;  $p = 0,971$ ), allerdings jeweils signifikant mehr als in der gesunden Kontrollgruppe (7,2 ± 3,8;  $p < 0,001$  für beide Vergleiche). Die CEC-Konzentration im Blut blieb während der EKZ annähernd gleich, stieg nach 6 Stunden deutlich an und erreichte nach 12 Stunden einen Höhepunkt, stets mit signifikant niedrigeren Werten in der MECC-Gruppe (6h: 29,6 ± 9,8 vs. 44,0 ± 9,9,  $p = 0,007$ ; 12h: 31,8 ± 7,1 vs. 48,1 ± 6,8,  $p < 0,001$ ). Trotz rückläufiger Tendenz in beiden Gruppen blieben die Zellzahlen nach 24 und 48 Stunden in der Standard-HLM-Gruppe signifikant höher (24h: 41,5 ± 9,3 vs. 30,7 ± 7,0,  $p = 0,011$ ; 48h: 38,6 ± 7,9 vs. 29,5 ± 5,9,  $p = 0,023$ ). Alle postoperativen Zellzählungen lagen zu jedem Zeitpunkt über den jeweiligen Ausgangswerten (Wilcoxon-Test:  $p = 0,05$ ).

#### 2.2.3.2. Von Willebrand Faktor Antigen (vWF:Ag)

Die vWF:Ag-Konzentration (IU/dl) war präoperativ im Plasma beider Versuchsgruppen vergleichbar (Standard HLM: 143,7 ± 48,9, MECC: 126,4 ± 33,7; MW-Test:  $p = 0,436$ ) und tendierte zu niedrigeren

Werten in der gesunden Kontrollgruppe ( $99,5 \pm 22,1$ , Standard HLM: MW-Test:  $p = 0,019$ ; MECC: MW-Test:  $p = 0,075$ ). Postoperativ stieg vWF:Ag in beiden Gruppen signifikant an (Friedman-Test:  $p < 0,001$ , Wilcoxon-Test:  $p = 0,005$  für jeden Test). Obwohl die postoperative vWF:Ag-Plasmakonzentration in der MECC-Gruppe tendenziell niedriger war (6h:  $191,1 \pm 59,4$  vs.  $230,0 \pm 83,0$ ; 12h:  $215,3 \pm 65,5$  vs.  $267,3 \pm 68,0$ ; 24h:  $242,9 \pm 64,9$  vs.  $298,8 \pm 76,2$ ; 48h:  $311,1 \pm 76,4$  vs.  $359,8 \pm 56,4$ ), waren die Unterschiede statistisch nicht signifikant (MW-Test:  $p > 0,085$  für jeden Test).

#### 2.2.3.3. Lösliches Thrombomodulin (sTm)

Die sTm-Plasmakonzentration (ng/ml) war bei präoperativen KHK-Patienten und gesunden Freiwilligen vergleichbar (Standard HLM  $2,3 \pm 1,3$ , MECC  $1,8 \pm 0,9$ , Kontrollgruppe  $1,7 \pm 0,8$ ; KW-Test:  $p = 0,638$ ). Der Friedman-Test dokumentierte signifikante Veränderungen in beiden Versuchsgruppen ( $p < 0,001$ ). Während die postoperativen sTM-Werte in der Standard-HLM-Gruppe zu jedem Zeitpunkt signifikant höher waren als präoperativ (Wilcoxon-Test:  $p = 0,005$  für jeden Test), war in der MECC-Gruppe nur der Anstieg nach 48 Stunden signifikant (Wilcoxon-Test:  $p = 0,005$ ). Nichtsdestotrotz bestand zu keinem postoperativen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen hinsichtlich der sTm-Plasmakonzentration.

#### 2.2.4. Diskussion

Zum gegebenen Zeitpunkt war dies die erste Studie, die die EKZ-assozierte Endothelschädigung mittels Bestimmung zirkulierender Endothelzellen im Blut der Patienten untersuchte. Die interessante Eigenschaft der CEC ist nicht nur, dass sie einen endothelialen Schaden aufzeigen, sondern dass sie mit dem Ausmaß der Schädigung korrelieren (60, 61). Bei unseren freiwilligen Kontrollpersonen kamen im Mittel 7 Endothelzellen pro Milliliter Blut vor, was in etwa den Ergebnissen anderer Untersucher entspricht (53, 62). Mutin et al. beobachteten erhöhte CEC-Werte bei ihren Patienten etwa 18 bis 24 Stunden nach einem akuten Myokardinfarkt, wohingegen Patienten mit stabiler Angina pectoris „normale“ CEC-Zahlen aufwiesen (56). Wir haben bereits präoperativ erhöhte CEC-Konzentrationen bei unseren elektiven Patienten mit stabiler Angina pectoris gefunden. Setzen wir voraus, dass Mutin et al. dieselbe Isolationstechnik und auch dieselben Kriterien für die Identifikation von Endothelzellen verwendeten, so muss nach unseren Vermutungen ein Unterschied in der Schwere der kardiovaskulären Arteriosklerose bestanden haben. Besonders wenn wir diese Ergebnisse mit den Ergebnissen unserer gesunden Kontrollpersonen vergleichen, müssen wir davon ausgehen, dass Patienten mit koronarer Herzerkrankung eine erhöhte und fortwährende Endothelschädigung aufweisen, was durch ebenfalls erhöhtes vWF:Ag bekräftigt wird. Interessanterweise war die präoperative Thrombomodulin-Kon-

zentration bei unseren Patienten unauffällig. Dies geht einher mit den Ergebnissen von Chong et al., die eine positive Korrelation zwischen CEC und vWF, aber nicht zwischen CEC und sTm fanden (63). Die Tatsache, dass die CEC-Konzentration im Blut nach EKZ signifikant ansteigt, könnte auf eine zusätzliche oder auch neue Endothelschädigung hinweisen. Da die zirkulierenden Endothelzellzahlen während der EKZ annähernd gleich blieben, gehen wir nicht von einer direkten mechanischen Schädigung aus, wie sie etwa bei der Kanülierung oder Bypassanastomosierung auftreten könnte. Der verzögerte Anstieg spricht eher für einen vermittelten Mechanismus der Endothelzellablösung, verursacht durch direkte Neutrophileninteraktion, Zytokine und Proteasen (53). Scholz et al. verfolgten ebenfalls diese Theorie und stellten Untersuchungen an Zellkulturen an. Sie fanden heraus, dass Neutrophile, die am Ende der EKZ aus dem Patientenblut isoliert wurden, endotheliale Zellkontakt- und -verankerungsmoleküle verändern und so die endotheliale Integrität stören (64). Dieser Theorie folgend wären die durch die HLM aktivierten Neutrophilen für die Ablösung der Endothelzellen verantwortlich. Sie gelangen in den Blutstrom und können dort mit entsprechend sensitiven Verfahren bestimmt werden können. CD 146 ist, mit Ausnahme einiger weniger Tumorzelllinien, auf adulten Endothelzellen exprimiert, und bietet sich somit hervorragend als Marker an (65). Wir modifizierten die immunomagnetische Zellseparationstechnik von Woywodt et al. (59) und bestimmten neben den zirkulierenden Endothelzellen von Willebrand Faktor und lösliches Thrombomodulin, zwei Parameter, die zur Beurteilung des Endothelzustandes herangezogen werden (63, 66, 67). CEC, vWF und sTm waren präoperativ am niedrigsten, blieben niedrig während der EKZ und waren 6 Stunden nach EKZ-Beginn erhöht. Während vWF und sTm weiter anstiegen, erreichten die Werte für die zirkulierenden Endothelzellen ihren Höhepunkt nach 12 Stunden, bevor sie wieder abfielen. Diese Beobachtungen trafen für beide HLM-Typen zu, wobei die endothelialen Marker in der Mini-HLM-Gruppe niedriger oder zumindest tendenziell niedriger waren. Die Unterschiede im technischen Aufbau beider Systeme wurden bereits im vorangegangenen Kapitel ausführlich diskutiert (2.1.4.).

Zirkulierende Endothelzellen ermöglichen die im Vergleich zu anderen Markern scheinbar akkuratere Abschätzung der endothelialen Läsion, die während der aortokoronaren Bypass-OP unter Einsatz der Herz-Lungen-Maschine entsteht. Es ist anzunehmen, dass es sich dabei um eine Aggravierung eines Endothelschadens handelt, der bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung im Gegensatz zu Gesunden permanent besteht. Durch die Miniaturisierung des extrakorporalen Kreislaufs scheint eine Begrenzung dieser imminenten Endothelschädigung möglich.

### **3. Organveränderungen unter extrakorporaler Zirkulation - Beobachtungen an ventrikulären Unterstützungssystemen**

#### **3.1. BNP und ET-1 korrelieren mit der Funktion und Morphologie des linken Ventrikels bei LVAD-Patienten**

##### **3.1.1. Einleitung**

Natriuretische Peptide werden im Herzen vermehrt bei exzessiver Volumenbelastung und Anstieg der Wandspannung freigesetzt und sollen durch Diurese, Natriurese und Vasodilatation kompensieren (68). Vor allem das B-Typ (brain) natriuretische Peptid (BNP), das in großen Mengen in fetalen und neonatalen Herzmuskelzellen gebildet wird, gilt bei Re-Expression und Re-Synthese in adulten Kardiomyozyten als spezifischer und sensitiver Marker bei der diagnostischen und prognostischen Beurteilung der Herzinsuffizienz (69-72). Ähnliches Interesse hat auch Endothelin-1 (ET-1) als Herzinsuffizienzmarker geweckt – ein Polypeptid, das in Endothel- und glatten Muskellzellen gebildet wird und eine stark vasokonstriktive, mitogene, aber auch fibrinogene Wirkung hat (73-75). Die ET-1-Serumkonzentration korreliert invers mit der linksventrikulären Ejektionsfraktion und geht somit einher mit dem Ausmaß der Herzschiädigung und der sich daraus ergebenden Mortalität (76). Vorläufige Untersuchungen haben ergeben, dass die mechanische Entlastung des kranken Ventrikels zur Abnahme dieser neuroendokrinen Hormone im Plasma führt (77, 78). Inwieweit sich BNP- und ET-1-Plasmaspiegel unter LVAD-Unterstützung verändern und mit klinischen, apparativ-messbaren Parametern (EF, LVEDD, HZV) und histopathologischen Befunden korrelieren, blieb bis dato unbeantwortet.

##### **3.1.2. Methodik**

###### **3.1.2.1. Patienten**

Nach Zustimmung der Ethikkommission des Baylor College of Medicine, Houston, Texas wurden 19 Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und im funktionellen NYHA-Stadium III-IV bei Indikationsstellung zur LVAD-Implantation nach Aufklärung und Einwilligung in die Studie aufgenommen. Die Patienten wurden gruppiert gemäß der Ätiologie ihrer Herzinsuffizienz, wonach bei 12 Patienten eine ischämische Kardiomyopathie (ICM) und bei 7 Patienten eine nicht-ischämische, dilatative Kardiomyopathie (DCM) bestand, und gemäß des implantierten LVAD-Typs: MicroMed DeBakey VAD (MicroMed Technologies, Houston, TX, USA, nonpulsatil, n = 6), Novacor VAD (Baxter

Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA, pulsatil, n = 8), TCI Heartmate (Thoratec Corp., Pleasanton, CA, USA, pulsatil, n = 3) und Thoratec VAD (Thoratec Corp., Pleasanton, CA, USA, pulsatil, n = 3). Die Analyse der Neurohormon-Plasmakonzentration und die echokardiographische Evaluation wurden unmittelbar vor LVAD-Implantation, während der mechanischen Kreislaufunterstützung und, soweit möglich, unmittelbar vor LVAD-Explantation zu bestimmten Zeitpunkten vorgenommen. Die histologischen Untersuchungen wurden an Gewebeproben durchgeführt, die bei der LVAD-Implantation bzw. bei der Explantation aus dem linksventrikulären Myokard entnommen wurden.

#### 3.1.2.2. Echokardiographie

Die echokardiographischen Daten wurden an einem Acuson Sequoia Ultraschallsystem (Acuson-Siemens, Mountain View, CA, USA) mit einem 2,5-MHz-Schallkopf erhoben. Zur Beurteilung der Herzfunktion wurden die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF in %), der linksventrikuläre enddiastolische Diameter (LVEDD in cm) und das Herzzeitvolumen (HZV in l/min) herangezogen.

#### 3.1.2.3. BNP und ET-1 Bestimmung

Die Blutproben wurden in Ethylendiamintetraacetat- (EDTA-) Monovetten auf Eis transportiert, ehe sie für 8 Minuten bei 4°C und 3500 U/min zentrifugiert wurden. Der Plasmaüberstand wurde aliquotiert und weiter verarbeitet oder in flüssigen Stickstoff gelegt und bis zur endgültigen Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der BNP-Konzentration wurde der Triage B-Type Natriuretic Peptide Test (Biosite Diagnostics Inc., San Diego, CA, USA) verwendet. Die Analyse basiert auf einem Fluoreszenzimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von BNP im Plasma mit einem validierten Messbereich von 5 bis 1300 pg/ml. Endothelin-1 wurde mit Hilfe des Human Endothelin-1 Immunoassay (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) in Sandwich-ELISA-Technik quantifiziert. Die minimale validierte Messkonzentration beträgt 0,1 pg/ml.

#### 3.1.2.4. Histologische Gewebeanalyse

Zur Quantifizierung des Kollagengehaltes wurde myokardiales Gewebe aus der Herzspitze des linken Ventrikels zum Zeitpunkt der LVAD-Implantation bzw. aus dem explantierten linken Ventrikel zum Zeitpunkt der Herztransplantation untersucht. Linksventrikuläres Myokard aus 6 nicht-transplantierten Spenderherzen diente als Kontrolle.

Die Gewebeproben wurden für 45 Minuten in 2% Paraformaldehyd gelegt, anschließend dehydriert und in Paraffin eingebettet. 5 µm dünne Schnitte wurden gemäß Standardprotokoll mit Picro-Sirius-Rot gefärbt und auf einen Objektträger gebracht. Unter dem Mikroskop wurde der Gesamtkollagengehalt der Probe als mittlere Summe aller angefärbten Areale innerhalb 10 mikroskopischer Gesichtsfelder

bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit der ImagePro Plus Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

#### 3.1.2.5. Statistik

Die Datenaufnahme und Berechnung erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler präsentiert. Varianzanalyse und Analyse der Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit ANOVA und dem Tukey-Kramer-Test durchgeführt. Zur Ergebnisbewertung wurden der David-Hartley-Pearson bzw. Mann-Whitney U -Test herangezogen. P-Werte kleiner 0,05 wurden dabei als signifikant gewertet.

### 3.1.3. Ergebnisse

Die demographischen Daten sind in Tabelle 3 gelistet.

Zum Zeitpunkt der LVAD-Implantation befanden sich alle Patienten in einem Herzinsuffizienzstadium NYHA III-IV unter ausgeschöpfter medikamentöser Therapie. Die durchschnittliche mechanische Unterstützungsdauer betrug  $54,79 \pm 8,65$  Tage, wobei 68,42 % der Patienten bis zur Transplantation überlebten.

Tabelle 3: Demographische Patientendaten

Kriterium	Wert
Anzahl (n)	19
Alter (Jahre)	$55,21 \pm 2,88$
Geschlecht (% männlich)	78,9
Ätiologie (% ischämisch)	63,2
LVAD-Dauer (Tage)	$54,79 \pm 8,65$
Überleben bis HTx (%)	68,42

#### 3.1.3.1. Echokardiographische Ergebnisse

Unter der LVAD-Unterstützung verbesserten sich die von uns beobachteten kardialen Funktionsparameter signifikant: die EF stieg von  $21\% \pm 3,8$  auf  $28\% \pm 3,57$  ( $p = 0,038$ ), der LVEDD sank von  $6,68 \text{ cm} \pm 0,92$  auf  $4,79 \text{ cm} \pm 1,54$  ( $p < 0,0001$ ) und das Herzzeitvolumen stieg von  $3,62 \text{ l/min} \pm 1,3$  auf  $4,93 \text{ l/min} \pm 0,2$  ( $p = 0,039$ ).



#### 3.1.3.2. BNP und ET-1 im Plasma

Die BNP- und ET-1-Plasmakonzentrationen sanken signifikant bis zum Ende der LVAD-Therapie: BNP fiel von  $754,1 \text{ pg/ml} \pm 261,1$  auf  $221,1 \text{ pg/ml} \pm 124,2$  ( $p < 0,0001$ ) und ET-1 von  $13,66 \text{ pg/ml} \pm 11,98$  auf  $3,47 \text{ pg/ml} \pm 2,96$  ( $p < 0,001$ ). Auffällig war ein zweimaliger, jeweils kurzzeitiger Anstieg von BNP und ET-1 in der 6. und 12. Woche nach LVAD-Implantation.

#### 3.1.3.3. Systemabhängige Veränderungen

Um den Einfluss des jeweiligen LVAD-Typs auf die Erholungstendenz des Myokards näher zu prüfen, wurden jeweils Quotienten aus EF und BNP oder ET-1 oder Kollagenanteil gebildet. Bei allen Devices kam es dabei zur Zunahme der jeweiligen Quotienten zum Ende der Unterstützungsphase. Im direkten Vergleich zeichneten sich signifikante Vorteile ab für die beiden pulsatilen Systeme von Novacor und TCI Heartmate gegenüber dem nonpulsatilen MicroMed DeBakey Device. Die durchschnittliche Supportdauer insbesondere des Novacor lag indes mit 80,13 Tagen deutlich über der des MicroMed DeBakey mit 27,67 Tagen. Zieht man in Betracht, dass bei den Verlaufskontrollen die plasmatische Neurohormonkonzentration über die Zeit ab- und die EF zunahm, lässt sich eine Bewertung oder gar Empfehlung für oder gegen ein bestimmtes Device von diesen Ergebnissen nicht ableiten.

#### 3.1.4. Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass die etablierten Herzinsuffizienzmarker BNP und ET-1 bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz unter vollkommener mechanischer Entlastung des linken Ventrikels mittels LVAD signifikant über die Zeit abnahmen. Parallel hierzu kam es zur Steigerung der Ejektionsfraktion und des Herzzeitvolumens, sowie zur Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Diameters. Schon vorher konnten wir in anderen Untersuchungen eine Abnahme des Kollagengehaltes und damit des Fibrosegrades des Myokards unter mechanischer Entlastung feststellen (79, 80).

Auch andere Forschergruppen haben den zeitlichen Verlauf von BNP bei LVAD-Patienten untersucht und dessen Wert bei der Einschätzung der Herzinsuffizienz erkannt (81, 82). Die Transkription natriuretischer Hormone ist unerlässlich für die Regulation des Volumenhaushaltes. Die prätherapeutisch erhöhten BNP-Werte der Herzinsuffizienzpatienten sind als endogener Kompensationsmechanismus zu sehen gegen die ansteigenden ventrikulären Füllungsdrücke, die anhaltende Dehnung der Herzmuskelzellen und den Anstieg bestimmter Wachstumsfaktoren wie Angiotensin II oder ET-1, die ebenfalls an der Pathologie der Herzinsuffizienz beteiligt sind (83). Dabei soll der Anstieg von ET-1 im Plasma von Herzinsuffizienzpatienten auf eine gesteigerte gefäßendotheliale Produktion bei vorlastbedingter sekundärer pulmonaler Hypertension zurückzuführen sein (84, 85). Es ist daher anzunehmen, dass ein nahezu paralleler Rückgang von BNP und ET-1, wie wir ihn bei unseren Patienten beobachten konn-

ten, Folge der Abnahme sowohl der myokardialen Wandspannung als auch der pulmonalarteriellen Drücke unter mechanischer ventrikulärer Unterstützung ist (86). Die Normalisierung der ventrikulären Funktionsparameter und der Rückgang der Neurohormone gingen einher mit der Verbesserung der morphologischen Ventrikelarchitektur. Die devicespezifischen Quotienten aus EF und Kollagenanteil oder BNP bzw. ET-1 bekräftigen diesen neurohormonalen-morphologischen-funktionellen Zusammenhang. Dies geht im Umkehrschluss einher mit dem Ergebnis anderer Studien, die die mechanische Überlastung des Myokards als Auslöser für die BNP-Ausschüttung und die Entstehung der Herzhypertrophie sehen. BNP kann hierbei direkt über Mechanorezeptoren oder autokrin/parakrin über Angiotensin II und ET-1 stimuliert werden, womit auch auf die Bedeutung der nicht-muskelzellulären Anteile des Myokards verwiesen wird (87, 88).

BNP und ET-1 korrelieren mit der Funktion und auch Morphologie des linken Ventrikels unter mechanischer Kreislaufunterstützung. Es sind zwei leicht zu bestimmende Echtzeit-Indikatoren, die es den Verantwortlichen ermöglichen, den Erholungszustand des Herzmuskels abzuschätzen, und somit der Entscheidungsfindung hinsichtlich Transplantationsdringlichkeit oder LVAD-Entfernung dienen können.

## **3.2. Mastzellen und deren Mediatoren beim myokardialen Re-Remodeling unter mechanischer linksventrikulärer Unterstützung**

### **3.2.1. Einleitung**

Die mechanische Entlastung des linken Ventrikels bei der terminalen therapierefraktären Herzinsuffizienz geht einher mit einem Re-Remodeling des Myokards. Es ändern sich der Kollagengehalt des Herzens, dessen Wanddicke, der Myozytendiameter und es kommt hierunter zur Verbesserung der linksventrikulären Geometrie wie auch Funktion (80, 89, 90). Unklar war bisher, wie es zu diesen Veränderungen kommt und welche Zellen beteiligt sind.

Mastzellen sind freie Bindegewebszellen, die bekanntlich bei allergischen Reaktionen, aber auch bei der Homöostase, beim Remodeling und bei der Reparatur von Gewebe eine wichtige Rolle spielen (91). Im Inneren der Mastzellen finden sich mehrere hundert Vesikel, die nach entsprechender Stimulation mit der Zellmembran verschmelzen und ihren Inhalt freigeben oder als intakte Vesikel mit der Membran aus der Zelle ausgeschleust werden. Chemisch enthalten diese Vesikel neben Wasser Histamin, Heparin, Glykosaminoglykane, chemotaktische Faktoren, Wachstumsfaktoren, Tryptase und/oder Chymase (92). Hinsichtlich ihres heterogenen Tryptase-/Chymase-Gehaltes klassifiziert man die Mastzellen in zwei Subtypen: Mastzellen mit Tryptase und Mastzellen mit Tryptase und Chymase

(93). Chymase stimuliert vermutlich über die Freisetzung des matrixgebundenen TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ) und Aktivierung des Angiotensin II die Kollagenproduktion in Fibroblasten, wohingegen Trypsin über die Aktivierung von Metalloproteinasen in der Lage ist, zum Kollagenabbau beizutragen (94-96). Entsprechend der vorherrschenden Proteasenverteilung können Mastzellen somit fibrogene als auch fibrolytische Eigenschaften besitzen.

Ebenfalls verschiedene Umbauvorgänge im Gewebe zu modulieren imstande ist bFGF (basic fibroblast growth factor, FGF-2), der im Myokard bis dato überwiegend in Kardiomyozyten, Fibroblasten und glatten Muskelzellen nachgewiesen wurde (97). Für unsere Untersuchungen machte ihn seine in der Literatur beschriebene Rolle bei der Manifestation der Herzhypertrophie und bei der Entstehung interstitieller Fibrose interessant (98, 99).

In dieser Studie untersuchten wir den Grad und das Verteilungsmuster interstitieller Fibrose, die Mastzell-dichte und die Mastzellphänotypie bei terminaler Kardiomyopathie vor und nach mechanischer linksventrikulärer Unterstützung. Zusätzlich bestimmten wir die Lokalisation und den Gehalt von bFGF in den Myokardproben.

#### **3.2.2. Material und Methodik**

##### **3.2.2.1. Patienten**

Zwanzig Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und im funktionellen NYHA-Stadium III-IV wurden entsprechend dem Protokoll der Ethikkommission des Baylor College of Medicine, Houston, Texas bei Indikationsstellung zur LVAD-Implantation nach Aufklärung und Einwilligung in die Studie aufgenommen. Die Ätiologie der Herzinsuffizienz war in 8 Fällen ischämischer (ICM) und in 12 Fällen idiopathischer Genese im Sinne einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM). Zur mechanischen Unterstützung wurden entweder das Novacor VAD (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL, USA) oder das TCI Heartmate (Thoratec Corp., Pleasanton, CA, USA), beides pulsatile Systeme, implantiert. Zusätzlich wurden Gewebeproben 7 nicht-transplantierter Spenderherzen untersucht. Die vollständige Aufarbeitung eines explantierten Herzens diente dazu, eventuell vorhandene regional spezifische Verteilungsmuster zu identifizieren.

##### **3.2.2.2. Mastzellbestimmung**

Die Untersuchungen wurden nach Implantation an dem bei der Platzierung der LVAD-Einflusskanüle erhaltenen Myokardkonus bzw. nach Explantation des LVAD zum Zeitpunkt der Herztransplantation an dem explantierten linken Ventrikel durchgeführt. Die Gewebeproben wurden für 45 Minuten in 2% Paraformaldehyd gelegt, anschließend dehydriert, in Paraffin eingebettet und in 5  $\mu$ m dünnen

Schnitten auf Objektträger aufgebracht. Die Mastzellldichte wurde immunhistochemisch unter Verwendung eines spezifischen anti-Tryptase Antikörpers (Chemicon, Temecula, CA, USA) bestimmt. Zur Ermittlung der Chymase-positiven Mastzellen wurden die Schnitte zusätzlich mit einem anti-Chymase Antikörper (Chemicon, Temecula, CA, USA) behandelt. Sekundärantikörper mit unterschiedlichen Signalmolekülen ermöglichten die Differenzierung. Die entsprechend markierten Zellen wurden unter dem Mikroskop innerhalb 10 aufeinanderfolgender Gesichtsfelder ausgewertet.

#### 3.2.2.3. Kollagengehalt

Zur Quantifizierung des Kollagengehaltes wurden entsprechende Serienschritte mit Picro-Sirius-Rot unter Verwendung des Standardprotokolls eingefärbt (3.1.2.4.).

#### 3.2.2.4. Basic Fibroblast Growth factor (bFGF)

Der Gehalt an bFGF im Myokard wurde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Die Gewebeproben wurden hierzu unter protokollierter Zugabe von Tris-HCL, Phenylmethylsulfonylfluorid, Leupeptin und Pepstatin für 30 Sekunden bei 4°C homogenisiert (PowerGen 700, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA) und anschließend für 10 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, auf ein 20% Polyacrylamid-Gel aufgetragen (50µg/Bahn) und in eine Elektrophorese-Apparatur eingespannt. Nach 6 Stunden bei 80 V Spannung wurden die Proteine auf ein Nitrozellulosepapier übertragen und fixiert. Diese Membran wurde dann entsprechend des Herstellerprotokolls mit einem spezifischen anti-human-FGF-2 Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert. Die Visualisierung der Proteine gelang durch die Verwendung des ECL Detection Systems (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). Die Bestimmung des bFGF-Gehaltes erfolgte semi-quantitativ über die Analyse der resultierenden Proteinbanden mit ImagePro Plus Software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

#### 3.2.2.5. Fluoreszenz-Mikroskopie von Mastzellen und bFGF

Die Gewebeschnitte wurden mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen humane Tryptase (NeoMarkers, Fremont, CA, USA) und mit Ziegen-Antikörper gegen humanes FGF-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert. Anschließend erfolgte die entsprechende Markierung mit Cy3-konjugiertem Schafs-Antikörper gegen Maus-IgG bzw. mit FITC-konjugiertem Hasen-Antikörper gegen Ziegen-IgG (jeweils Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). DNA wurde mit DAPI (Vectashield Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) angefärbt. Die so präparierten Gewebeschnitte wurden unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

### 3.2.2.6. Statistik

Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler präsentiert. Einseitige Varianzanalyse (ANOVA) wurde durchgeführt, um die Mastzellichte in den verschiedenen Herzregionen zu analysieren. Der Student's t-Test wurde herangezogen, um Mastzellichte und bFGF-Gehalt im Myokard der Patienten vor und nach LVAD-Unterstützung zu bewerten. P-Werte kleiner 0,05 wurden dabei als signifikant gewertet.

### 3.2.3. Ergebnisse

Die demographischen Daten sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Zum Zeitpunkt der LVAD-Implantation befanden sich alle Patienten in einem Herzinsuffizienzstadium NYHA III-IV unter ausgeschöpfter medikamentöser Therapie. Die durchschnittliche mechanische Unterstützungsdauer betrug  $54,3 \pm 11,8$  Tage, wobei der Device-Typ keinen Einfluss auf das Patienten-Outcome hatte.

Tabelle 4: Demographische Patientendaten

Kriterium	Wert
Anzahl (n)	20
Alter (Jahre)	$53,7 \pm 1,6$
Geschlecht (% männlich)	100
Ätiologie (% ischämisch)	40
LVAD-Dauer (Tage)	$54,3 \pm 11,8$

#### 3.2.3.1. Mastzellen im Myokard

Die Mastzellverteilung (Anzahl der Zellen/10 Mikroskopiefelder) war in allen Ventrikelabschnitten gleich (ANOVA,  $p = 0,14$ ). Mastzellen fanden sich vornehmlich in Regionen vermehrter interstitieller Fibrose, unmittelbar Kardiomyozyten anliegend. Im gesunden Myokard gab es signifikant weniger Mastzellen als im erkrankten Herzen, unabhängig von der Genese ( $13,8 \pm 1,9$  vs.  $32,1 \pm 2,3$ ,  $p = 0,04$ ). Nach LVAD-Implantation kam es in Abhängigkeit von der Supportdauer zu Veränderungen der Mastzellichte: nach kurzzeitiger Unterstützung ( $< 40$  Tage) waren die Mastzellzahlen unverändert zu den Ausgangszahlen vor LVAD-Implantation. Nach Langzeit-LVAD-Unterstützung ( $> 40$  Tage) stieg die Mastzellichte im Myokard signifikant an ( $57,4 \pm 8,6$  vs.  $45,1 \pm 7,6$ ,  $p < 0,01$ ). Bei den hinzugekommenen Mastzellen handelte es sich hauptsächlich um Chymase-negative Mastzellen. Der Quotient aus Chymase-positiven Mastzellen und Gesamtmastzellen sank dabei signifikant ( $p = 0,01$ ).

#### 3.2.3.2. Basic Fibroblast Growth factor (bFGF)

Unsere immunhistochemischen Färbungen haben gezeigt, dass bFGF im Myokard ausschließlich in Mastzellen lokalisiert war. Zur Quantifizierung von bFGF vor und nach LVAD-Support wurden Western Blot Analysen durchgeführt. Hier war trotz höherer Mastzellzahlen ein signifikanter Abfall der bFGF-Konzentration im post-LVAD-Myokard zu verzeichnen ( $p < 0,01$ ).

#### 3.2.4. Diskussion

Sowohl die dilatative als auch die ischämische Kardiomyopathie gehen einher mit einer Anhäufung interstitiellen Kollagens, vornehmlich Kollagen Typ I, was zu einer gewissen ventrikulären Steifheit und folglich zur diastolischen Dysfunktion führt (100, 101). Unter mechanischer Langzeitunterstützung kam es nun zum Rückgang der Myokardfibrose (80, 100).

Mit dieser Studie konnten wir zeigen, dass die Mastzelle, ein Zelltyp, der primär mit allergischen Abwehrreaktionen in Verbindung gebracht wird, bei der Entstehung einer Kardiomyopathie, aber auch bei der Regeneration des Myokards beteiligt ist. Die Anzahl der Mastzellen im geschädigten Myokard ist unabhängig von der Genese signifikant höher als im normalen Herzgewebe. Ein weiterer Anstieg vornehmlich Chymase-negativer Mastzellen konnte im Myokard jener Herzen festgestellt werden, die aufgrund ihrer terminalen Insuffizienz mechanisch unterstützt werden mussten. Parallel hierzu beobachteten wir einen Rückgang von myokardialem bFGF, welcher interessanterweise nur in Mastzellen nachzuweisen war. Dies lässt vermuten, dass der unter LVAD-Support beobachtete Rückgang der Myokardfibrose begleitet ist von einer Verschiebung des Gleichgewichts von pro- und antifibrogenen Mastzellmediatoren.

Einige Studien untersuchten bereits den in vivo als auch den in vitro Effekt von Mastzellmediatoren auf die Extrazellulärmatrix, wobei die Ergebnisse zum Teil widersprüchlich sind. Zum einen soll Tryptase die Entstehung interstitieller Fibrose fördern (102, 103), zum anderen trägt Tryptase über die Spaltung von Fibronectin, Fibrinogen und Kollagen IV und über die Aktivierung von pro-MMP-3 aber auch zum Abbau der Extrazellulärmatrix bei (104, 105). Entsprechend gilt Chymase als fibrinogen auf Grund der Potenz, Angiotensin I in Angiotensin II umzuwandeln, Prokollagen I zu aktivieren und die Ausschüttung von TGF- $\beta$  zu fördern (96, 104, 106-108). Jedoch soll Chymase auch MMP-1 und MMP-9 aktivieren, sowie TIMP-1 inhibieren (109, 110).

In unseren Untersuchungen korrelierte das Ausmaß interstitieller Fibrose mit dem Anteil Chymase-positiver Mastzellen wie auch mit dem Gehalt von bFGF. bFGF soll aber ebenso mit Muskelregeneration korrelieren, wobei in späteren Regenerationsstadien dessen Gehalt wieder abnimmt (111). So könnte der erniedrigte bFGF-Gehalt im post-LVAD Myokard auch Ausdruck einer gewissen Regeneration sein.

Wir vermuten, dass es sowohl bei der Entstehung einer Kardiomyopathie als auch unter mechanischer Entlastung des geschädigten Ventrikels zu Veränderungen in der myokardialen Mastzellpopulation kommt, die dann entweder direkt oder fibroblastenvermittelt in die Gewebshomöostase eingreift.

### **3.3. Interaktion zwischen myokardialen Mastzellen und kultivierten Fibroblasten**

#### **3.3.1. Einleitung**

Fibroblasten stellen den Hauptanteil der nicht-muskulären Zellpopulation im Myokard und befinden sich im Interstitium, in Bereichen zwischen und um Kardiomyozyten. Sie synthetisieren Proteine der Extrazellulärmatrix wie fibrilläres Kollagen Typ I und III, das Kollagen Typ IV der Grundmembran, Fibronectin und Laminin. Eine Balance zwischen Synthese und Abbau dieser Matrix ist die Voraussetzung für die Entwicklung von Herzmuskulatur und für eine physiologische Herzfunktion. In experimentellen Modellen ging Herzhypertrophie stets mit Kollagenumbau und -akkumulation einher. Im vorangegangenen Abschnitt haben wir auf den potenziellen Zusammenhang zwischen Mastzellen und Fibroblasten im Myokard terminal insuffizienter Herzen hingewiesen (79). Wir haben vermutet, dass Mastzellen durch die krankheits- bzw. regenerationsphasenabhängige Konstellation ihrer Mediatoren die fibroblastenvermittelte Matrixproduktion im Myokard beeinflussen. Um diese Behauptung zu stützen, untersuchten wir die direkte Mastzell-Fibroblasten-Interaktion in einem in vitro Modell. Wir kultivierten Fibroblasten zusammen mit Mastzellen, die aus terminal insuffizientem Myokard mit und ohne vorangegangene LVAD-Unterstützung isoliert wurden, und quantifizierten die jeweilige Kollagenproduktion. Des Weiteren bestimmten wir die Heat-Shock-Protein-47 (HSP-47) -Expression in Kardiofibroblasten – ein spezifischer Induktor der Prokollagen- und Kollagensynthese (112).

#### **3.3.2. Material und Methodik**

##### **3.3.2.1. Isolation myokardialer Mastzellen**

Für die Untersuchung wurden 10 explantierte Herzen von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) zum Zeitpunkt der Transplantation herangezogen. Fünf dieser Patienten waren vor der Transplantation an einem Assist-System (LVAD). Die explantierten Herzen wurden mit 4°C kalter Kochsalzlösung gespült. Der linke Ventrikel einschließlich Septum wurden entfernt und in kalter Hanks balanced salt solution (HBSS) behandelt, bevor er in 1-2 mm große Fragmente zerteilt wurde. Diese Gewebestücke wurden mit einem enzymatischen Dispersionspuffer aus HBSS, Kollagenase Typ II,

Hyaluronidase, Protease und Desoxyribonuklease bei 37°C in 3 Schritten jeweils 30 min, 15 min und 15 min inkubiert. Nach jeder Inkubation wurde der Überstand durch ein 70 µm Sieb gefiltert, mit HBSS verdünnt und zentrifugiert. Die so erhaltenen Zellanteile aus den jeweiligen Isolationsschritten wurden zusammen in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) resuspendiert.

#### 3.3.2.2. Kollagenproduktion

In einer konfluierenden, einschichtigen Fibroblasten-Zellkultur wurde über den Einbau von radiomarkiertem  $^3\text{H}$ -Prolin die biosynthetische Aktivität bestimmt. Hierzu wurden Fibroblasten in 2 ml DMEM mit 10% fetalem Kälberserum gelöst und auf Zellkulturplatten aufgetragen. Vor der Mastzellisolation wurde das Nährmedium in der mittlerweile konfluierenden Zellkultur gegen DMEM mit nur noch 2% fetalem Kälberserum getauscht, um suboptimale Wachstumsbedingungen zu schaffen. Im Kontrollansatz wurde nur  $^3\text{H}$ -Prolin zur Zellkultur gegeben. In den Versuchsansätzen wurden zusätzlich entweder Mastzellen oder Mastzellen und das spezifische degranulationsfördernde Compound 48/80 hinzugefügt. Nach 12 Stunden wurden die Aliquots aus gewaschenen Zellen und Matrix mittels szintillatorischer Zählung ausgewertet, um den Einbau von radiomarkierten Prolin in Proteine zu quantifizieren. Ein jeweils zweites Aliquot diente nach Kollagenase-Behandlung der Ermittlung von Nicht-Kollagen-Anteilen.

#### 3.3.2.3. Heat-Shock-Protein-47 (HSP-47)

Der HSP-47-Anteil im Myokard wurde immunhistochemisch unter Verwendung eines spezifischen anti-HSP-47 Antikörpers (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada) ermittelt. Sekundärantikörper mit Signalmolekülen ermöglichten den Nachweis entsprechend markierter Strukturen unter dem Mikroskop mit 40-facher Vergrößerung innerhalb eines Gesichtsfeldes.

#### 3.3.2.4. Statistik

Die Datenaufnahme und Berechnung erfolgte mit der Statistiksoftware GraphPad Prism 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler präsentiert. Analyse der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit Student's t-Test für unabhängige Proben durchgeführt. P-Werte kleiner 0,05 wurden dabei als signifikant gewertet.



### **3.3.3. Ergebnisse**

#### **3.3.3.1. Mastzell-/Fibroblasten-Zellkultur**

Mittels radiometrischer Messung des  $^3\text{H}$ -Prolin-Einbaus wurde nach 12-stündiger Inkubation der Grundumsatz der Proteinsynthese in den Kontrollansätzen (nur Fibroblasten) erfasst. Der Anteil an Kollagen- und Nicht-Kollagen-Proteinen war hierbei annähernd gleich. Durch Zugabe von Mastzellen änderte sich dieser Grundumsatz nicht, unabhängig davon, ob die Mastzellen aus vorher LVAD-unterstütztem oder nicht-LVAD-unterstütztem Myokard isoliert wurden. Erst die zusätzliche Gabe des degranulationsfördernden Compound 48/80 beeinflusste die Proteinproduktion. Die so stimulierten Mastzellen aus DCM-Myokard (ohne LVAD-Unterstützung) erhöhten die Proteinproduktion auf 192% des Grundumsatzes ( $p < 0,01$ ), wohingegen stimulierte Mastzellen aus LVAD-unterstütztem Myokard die Proteinproduktion um 63% auf 47% des Grundumsatzes bremsten ( $p < 0,01$ ).

#### **3.3.3.2. HSP-47-Gehalt im Myokard**

HSP-47 war ausschließlich in Zellen nachzuweisen, die auch positiv auf den Mesenchymalzellmarker Vimentin reagierten. Im gesunden Myokard befand sich durchschnittlich nur eine HSP-47-positive Zelle pro mikroskopischem Gesichtsfeld. In Gewebeschnitten von Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie waren signifikant mehr HSP-47-positive Zellen nachzuweisen (34 Zellen/Gesichtsfeld,  $p < 0,01$ ), während unter LVAD-Support ein erneut signifikanter Rückgang auf annähernd normale Zellzahlen zu verzeichnen war (8 Zellen/Gesichtsfeld,  $p < 0,01$ ).

### **3.3.4. Diskussion**

Mit diesen Experimenten konnten wir zeigen, dass Mastzellen in der Lage sind, die Proteinsynthese in Fibroblasten zu beeinflussen, aber nur dann, wenn sie zur Degranulation angeregt werden, wie in diesem Fall mit Compound 48/80. Ob die zusammen mit den Fibroblasten kultivierten und stimulierten Mastzellen die Produktion von Proteinen antreiben oder eher bremsen, hängt wesentlich vom Zustand des Myokards ab, aus dem sie isoliert wurden. Mastzellen, die aus einem DCM-Herzen stammen, steigern den Grundumsatz in den Fibroblasten, während Mastzellen aus einem LVAD-unterstützten Myokard die Proteinproduktion erheblich verringern. Die Ergebnisse dieser in vitro Studie gehen einher mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Untersuchungen unserer Gruppe, in denen wir einen Zusammenhang zwischen der mastzellulären Funktionalität und dem myokardialen Remodeling vermuteten (79). So nimmt im Verlauf einer Kardiomyopathie nicht nur der interstitielle Fibrosierungsgrad, sondern auch die Zahl vor allem Chymase-positiver Mastzellen im Myokard deutlich zu. Die fakultativ vorhandene Chymase dient neben der stets vorhandenen Tryptase der Phänotypisierung der

Mastzellen und besitzt vermutlich über die Konversionsfähigkeit von Angiotensin I zu Angiotensin II eine außerordentlich hohe profibrotische Potenz (106, 107).

Muss das geschädigte Herz bei ausgereizter medikamentöser Therapie durch ein maschinelles ventrikuläres Assist Device unterstützt werden, kommt es in dieser Phase der funktionellen Entlastung zu weiteren strukturellen Umbauvorgängen, dem sog. Re-Modeling, bei dem der myokardiale Fibrosierungsgrad wieder abnimmt und die Ventrikelfunktion sich zu erholen scheint (80, 90). Interessanterweise stiegen unter diesen Bedingungen die Mastzellzahlen weiter an, diesmal jedoch hauptsächlich Chymase-negative Mastzellen. Es wird vermutet, dass durch das Fehlen von Chymase die Zusammensetzung auch der übrigen mastzellulären Zytokine und Wachstumsfaktoren beeinflusst wird und somit die antifibrotische Wirkung überwiegt (113). In der Literatur finden sich diesbezüglich mehrere Theorien der Mastzell-Interaktion: Aktivierte Mastzellen setzen Mediatoren frei, die wiederum bei Fibroblasten und Endothelzellen die Freisetzung von Extrazellulärmatrix abbauenden Proteasen bewirken (114). Mastzellen können aber auch inaktive Proteasen wie pro-MMP-3, pro-MMP-9 oder pro-Urokinase aktivieren (115-117). Chancey et al. berichteten über die Aktivierung von MMP-2 durch Mastzelldegranulation in Rattenherzen (118). Schließlich können die Mastzellproteasen die Extrazellulärmatrix direkt abbauen (119); Farajado et al. haben gezeigt, dass  $\beta$ -Tryptase Gelatin spaltet und Kollagen I denaturiert (120).

Neben den Zellkulturen haben wir auch die HSP-47-Expression im Myokard untersucht, um Hinweise auf die Kollagenproduktion in vivo zu bekommen. HSP-47 bindet im Endoplasmatischen Retikulum an Prokollagenmoleküle und dient so der Stabilisierung des Prokollagens, verhindert die vorzeitige Aggregation in oligomere Formen und moduliert den Transport zum Golgi-Apparat bis zur Sekretion (112). Die Expression von HSP-47 geht hierbei einher mit der Expression von Kollagen I und III (121). Nachdem wir unsere Gewebeproben entsprechend immunhistologisch eingefärbt hatten, konnten wir im gesunden Myokard nur wenige Zellen sehen. In DCM-Gewebe war ein signifikanter Anstieg an HSP-47- und Vimentin-positiven Zellen zu verzeichnen – ein Hinweis auf eine erhöhte Kollagenproduktion. Die Auswertung der Gewebeschnitte von DCM-Herzen, die sich vorher an einem linksventrikulären Assist-System befanden, ergab wiederum deutlich weniger, annähernd normal viele Zellen, was auf einen Rückgang der Kollagensekretion unter Entlastung hindeutete.

Zusammenfassend könnte der unter linksventrikulärem Assist beobachtete Rückgang der Myokardfibrose Ausdruck eines Re-Modelingprozesses sein, der in noch nicht bekanntem Umfang von einer phänotypisch und/oder funktionell veränderten Mastzellpopulation getragen wird. Als mögliche Mechanismen kommen sowohl die Hemmung der überschießenden fibroblastären Kollagenproduktion als auch der gesteigerte Abbau der Extrazellulärmatrix in Betracht.

## **4. Diskussion**

Extrakorporale Kreislaufunterstützungssysteme ermöglichen, korrigierende Eingriffe am Herzen vorzunehmen oder die Funktion des Herzens teilweise oder ganz, kurz- oder langfristig zu übernehmen. Obwohl in vielen Fällen lebensverlängernd oder gar lebensrettend, greift die maschinelle Aufrechterhaltung der Zirkulation in die Physiologie des Körpers und der Organfunktionen ein.

### **4.1. Die Pathologie der Herz-Lungen-Maschine bei kardiochirurgischen Standardeingriffen**

Der Patient, dessen arterieller Blutfluß während eines Eingriffs am offenen Herzen, wenn auch nur für kurze Zeit, von einer Herz-Lungen-Maschine übernommen wird, befindet sich in einem abnormen Zustand, der die meisten, wenn nicht alle physiologischen Vorgänge beeinträchtigt. Ist sein Blut bisher durch mit Endothel ausgekleidete Gefäße geflossen, wird es während der EKZ durch körperfremde Materialien geleitet. Als Folge dieses Kontaktes zwischen Blutkomponenten und Fremdoberflächen kommt es zur Aktivierung einer Vielzahl von humoralen und zellulären Bestandteilen des Abwehrsystems und es droht eine systemische Entzündungsreaktion, das sogenannte SIRS (20-25). Das Ausmaß dieser Reaktion hängt ab von der Oberfläche der Biomaterialien, der Perfusionsdauer, der Temperatur, dem Blut-Wund-Kontakt und nicht zuletzt von intraindividuellen Patientenfaktoren, wie Komorbiditäten, Allgemeinzustand und Alter (26-31). Klinisch beobachtet man Fieber, Gerinnungsstörungen, pulmonale, renale und/oder gastrointestinale Dysfunktionen, Leberfunktionsstörungen, sowie neurologische und neurokognitive Ausfälle (25, 122-126). Westaby beschrieb dieses Phänomen als sogenanntes „Postperfusionssyndrom“ (127).

Die Vermutung lag nahe, dass durch strikte Reduktion der Fremdoberflächen und durch Modifikation im apparativen Aufbau hinsichtlich dieser Pathologie Verbesserungen zu erzielen sind. Bei den Mini-HLM-Systemen handelt es sich um geschlossene Systeme, bei denen man auf das venöse Hartschalenreservoir einschließlich Kardiotomiesaugereinheit verzichtet, Schlauchverbindungen verkürzt oder Shuntlinien gänzlich einspart und als Antrieb die Rollenpumpe gegen eine Zentrifugalpumpe ersetzt. Man erreicht eine Einsparung des zur Vorfüllung der HLM notwendigen Primingvolumens von 1,5 l auf 500 ml, welches beim ersten Umlauf in vollem Umfang den Patientenkreislauf erreicht und zu einer signifikanten Hämodilution mit möglichen Konsequenzen auf Sauerstofftransportkapazität, kolloidosmotischen Druck, Elektrolyt-Homöostase und Granulozytenaktivierung führt (46, 128, 129). Darüber hinaus entfällt mit der Kardiotomiesaugereinheit die ständige Retransfusion von perikardialen Saugerblut, das zusammen mit der Oberflächenaktivierung im Reservoir für eine Vielzahl inflammatorischer Reaktionen im Rahmen von HLM-assistierten Herzoperationen verantwortlich gemacht

wird (29, 40, 41). Aber auch die Art der Pumpe beeinflusst die Homöostase des Blutes. Es gelang zu zeigen, dass der Einsatz von Zentrifugalpumpen anstelle von Rollenpumpen nicht nur eine geringere Hämolyse und Thrombozytenaktivierung zur Folge hat, sondern auch das postoperative Outcome der Patienten vor allem hinsichtlich neurologischer Komplikationen entscheidend verbessert (49-51).

In unserer ersten Studie bewies das miniaturisierte HLM-System eine verbesserte perioperative Myokardprotektion gegenüber der Standard-HLM. Eine eindeutige Erklärung wurde bisher nicht gefunden. Möglich wäre ein direkter Zusammenhang zwischen myokardialer Schädigung und inflammatorischen Prozessen, welche sowohl durch den Kontakt mit der Fremdoberfläche, aber auch durch die Hämodilution initiiert werden (42-44). Letztere könnte über die affektierte Sauerstofftransportkapazität einen zusätzlichen Beitrag leisten. Ein weiterer Aspekt ergibt sich unserer Ansicht nach aus der Geschlossenheit der Mini-HLM. Hierdurch ist es nicht wie bei konventionellen Systemen möglich, zwischenzeitlich größere Mengen Volumen aus dem Patienten in das venöse Reservoir umzuverteilen. Als Folge besteht ein minimaler koronarer "Restfluss", der zwar, verwendet man kein entsprechendes Spül- oder Saug-Device, bei der koronaren Anastomosenanlage unter Umständen hinderlich sein kann, der aber auch zuverlässig Luft im Koronarsystem verhindert und, wenn auch wahrscheinlich nur minimal, eine gewisse Myokardversorgung erlaubt. Ebenfalls zu diskutieren ist die von uns und anderen beobachtete häufigere spontane Wiedererlangung von Sinusrhythmus nach Aortenöffnung bei Verwendung der Mini-HLM (38). Nicht nur, dass dies bereits Ausdruck einer verminderten myokardialen Affektion sein kann, es entfällt auch die Notwendigkeit der Defibrillation im Falle von Kammerflimmern in der frühen Reperfusionphase mit dem damit verbundenen, wenn auch geringen Anstieg der Herzenzyme (130, 131).

In einem weiteren Projekt haben wir erstmalig die Funktion und den Zustand des Endothels von Patienten mit koronarer Herzerkrankung vor, während und nach aortokoronarer Bypassversorgung untersucht. Hierzu haben wir uns des neuen und von Woywodt et al. modifizierten Verfahrens der zirkulierenden Endothelzell-Enumeration bedient (59). Die Wertigkeit dieses Verfahrens liegt in der Möglichkeit, nicht nur einen endothelialen Schaden aufzuzeigen, sondern sogar das Ausmaß einer derartigen Schädigung als direkte Korrelation zu den zirkulierenden Endothelzellen bestimmen zu können (60, 61). Wir konnten so feststellen, dass bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung im Gegensatz zu Gesunden ein chronischer Endothelschaden besteht, der im Rahmen der aortokoronaren Bypass-OP sogar noch zunimmt. Vorteile hatte auch hier die Mini-HLM, unter deren Einsatz die endotheliale Irritation signifikant geringer ausfiel. Da wir nicht von einer direkten mechanischen Schädigung, wie sie etwa bei der Aortenkanülierung oder Bypassanastomosierung auftritt, ausgehen, ist eher ein indirekter Mechanismus der Endothelzellablösung über Neutrophileninteraktion, Zytokine und Proteasen anzunehmen (53).

Heute ist der maschinelle kardiopulmonale Bypass ein Standardverfahren mit geringem Risiko für Patienten, die elektiv zur Herzoperation kommen. Eine ständig älter werdende, zum Teil multimorbide Patientenpopulation und der steigende Bedarf an komplexen Kombinations- und Revisionseingriffen erfordern in zunehmenden Maße die kritische Indikationsstellung und die stringente Abwägung von Risiko und Erfolgsaussichten für den geplanten Eingriff. Nicht nur, aber speziell diese Hochrisiko-Patienten werden von dem Einsatz solcher minimierten Herz-Lungen-Maschinen profitieren, die die Sicherheitsstandards der konventionellen Systeme bieten, jedoch ein geringeres Operationstrauma verursachen und so vergleichbar wenig in die Physiologie des Körpers eingreifen.

#### **4.2. Kardiale Veränderungen während mittel- bis langfristiger mechanischer Entlastung mittels linksventrikulärem Assist Device**

Die Entstehung der terminalen Herzinsuffizienz ist ein komplexer, zeitlich meist protrahierter Vorgang, dessen Ätiologie nicht vollständig bekannt ist. Es stehen myokardiale Infarzierung und Hypertension im Vordergrund, aber auch virale Infektionen, Toxinexposition, Chemotherapeutika und genetisch bedingte Muskelerkrankungen kommen als Auslöser in Betracht. Unabhängig vom zugrunde liegenden Agens geht die Entwicklung der terminalen Herzinsuffizienz einher mit der Hypertrophierung des Herzmuskels, der Ausbildung einer interstitiellen Fibrose und dem Nachlassen der Kontraktilität, Vorgänge, die unter dem Begriff des „(myo-) kardialen Remodeling“ zusammengefasst werden. Die Indikation für ein Assist Device ist dann gegeben, wenn das derart umstrukturierte Herz trotz intravenöser inotroper Therapie nicht mehr in der Lage ist, eine ausreichende Perfusion des Körpers zu gewährleisten (132, 133). Neben der Aufrechterhaltung der Endorganfunktionen erlaubt das VAD die vollständige Entlastung des primär pumpinsuffizienten Ventrikels, wodurch erneute strukturelle Veränderungen im Myokard initiiert werden. Im Rahmen dieser als „reverse Remodeling“ oder kurz „Re-Remodeling“ zu bezeichnenden Vorgänge konnten wir einen signifikanten Rückgang der interstitiellen Fibrose im mechanisch entlasteten Ventrikel feststellen (79, 80). Nach unseren Ergebnissen ist dieser neuerliche Umbau unter VAD-Support durch die Verschiebung des physiologischen Gleichgewichtes zwischen Kollagenaufbau und -abbau im Myokard zu Gunsten der antifibrotischen Mediatoren bedingt. Hier hat möglicherweise die Mastzelle eine zentrale Position bei der Modulation dieser Vorgänge. Unter mechanischer Entlastung haben sich die Phänotypie und/oder die spezifische Konstellation der Mastzellpopulation im Myokard geändert. In nachfolgenden in vitro Versuchen konnten wir die direkte Interaktion zwischen Mastzellen und den für die Kollagenproduktion verantwortlichen Fibroblasten nachweisen (134). In Zellkulturen haben Mastzellen aus DCM-Herzen den Proteingrundumsatz in den Fibroblasten deutlich gesteigert, während Mastzellen, die nach LVAD-Unterstützung aus dem Myokard isoliert wurden, die fibroblastäre Proteinproduktion signifikant reduzierten.

Die strukturellen Veränderungen im Myokard wurden anhand von Gewebeproben zum Zeitpunkt der LVAD-Implantation bzw. der LVAD-Explantation analysiert. Nichtsdestotrotz unterstanden die Patienten einem intensiven Monitoring während der Zeit am LVAD. Die Vermutung, dass es im Rahmen des Re-Modeling zur Verbesserung der kardialen Funktionsparameter kommt, hat sich bestätigt. Darüber hinaus lies sich ein signifikant korrelierender Zusammenhang zu den etablierten Herzinsuffizienzmarkern BNP und ET-1 herausarbeiten, was die Vermutung der myokardialen Erholung am Assist Device bekräftigte (90). Es ist somit auch nicht verwunderlich, dass es mittlerweile Veröffentlichungen über erfolgreiches Weaning vom LVAD mit guten Langzeitverläufen gibt (135). Die Patienten in unseren Studien wurden bis zur Herztransplantation am Assist Device unterstützt. Ein Weaning vom mechanischen Ventrikel ohne Transplantation war trotz der funktionellen Verbesserung der Herzindizes aufgrund der zum Studienzeitpunkt in den USA geltenden FDA-Bestimmungen nicht vorgesehen.

### **4.3. Zusammenfassung der übergreifenden Effekte von HLM und VAD und Ansätze zu deren Modifikation**

Die maschinelle Kreislaufunterstützung stellt einen massiven Eingriff in die Homöostase des Blutes, der Organe und der Gewebe dar. Das Ausmaß eventueller Organschäden hängt wesentlich von der Konfiguration und Betriebsdauer des extrakorporalen Systems sowie von der bestehenden Morbidität des Patienten ab. Die HLM ist als Kurzzeit-Kreislaufunterstützung während herzchirurgischer Eingriffe zu verstehen. Als solche wird bei deren Einsatz auf minimales Bluttrauma fokussiert. Biokompatible Oberflächenbeschichtungen, atraumatische Komponenten, Verminderung der Fremdoberflächen und Vermeidung von Blut-Luft-Kontakt begründen das Konzept der Mini-HLM, deren positive Effekte mittlerweile hinlänglich dokumentiert sind.

VADs enthalten weitaus weniger traumatisierende Komponenten als die HLM. Ihre Pathogenität resultiert aus der üblicherweise langen Betriebsdauer. Während der Einsatz der HLM im Rahmen von Herzoperationen praktisch in jedem Fall eine Wiedererholung der Myokardfunktion impliziert, ist der Wert von VADs für die myokardiale Regeneration bei terminaler Herzinsuffizienz Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion.

Die vorliegende Arbeit liefert klinisch-experimentelle Ansätze, wie durch gezielte Modifikation der HLM schädigende Nebeneffekte wie Inflammation und Myokardschädigung vermindert werden können. Weiterhin wird aufgezeigt, dass es möglich ist, ein terminal geschädigtes Myokard mittels VAD langfristig zu unterstützen und so regenerative Prozesse auf zellulärer und subzellulärer Ebene zu induzieren. Unter diesem Gesichtspunkt kommt den VADs nicht nur eine überbrückende, sondern eine vollkommen neue, langfristig therapeutische Bedeutung zu.

## 5. Referenzen

1. Loebell CE. De conditionibus quibus secretiones in glandulis perficiuntur. Dissertatio Inauguralis Marburgensis. 1849.
2. von Frey MG, Gruber M. Untersuchungen über den Stoffwechsel isolierter Organe. Ein Respirationsapparat für isolierte Organe. Archiv für Anatomie und Physiologie. Physiologische Abtheilung. Leipzig. 1885;6:519-32.
3. Gibbon JH, Jr. Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. Minn Med. 1954;37:171-85; passim.
4. Lillehei CW, Varco RL, Cohen M, Warden HE, Patton C, Moller JH. The first open-heart repairs of ventricular septal defect, atrioventricular communis, and tetralogy of Fallot using extracorporeal circulation by cross-circulation: a 30-year follow-up. Ann Thorac Surg. 1986;41:4-21.
5. Dewall RA, Gott VL, Lillehei CW, Read RC, Varco RL, Warden HE. Total body perfusion for open cardiectomy utilizing the bubble oxygenator; physiologic responses in man. J Thorac Surg. 1956;32:591-603.
6. Lillehei CW, Dewall RA, Read RC, Warden HE, Varco RL. Direct vision intracardiac surgery in man using a simple, disposable artificial oxygenator. Dis Chest. 1956;29:1-8.
7. Donald DE, Harshbarger HG, Kirklin JW. Studies in extracorporeal circulation. II. A method for the recovery and use of blood from the open heart during extracorporeal circulation in man. Ann Surg. 1956;144:223-7.
8. Harshbarger HG, Kirklin JW, Donald DE. Studies in extracorporeal circulation. IV. Surgical techniques. Surg Gynecol Obstet. 1958;106:111-8.
9. Kirklin JW, Donald DE, Harshbarger HG, Hetzel PS, Patrick RT, Swan HJ, et al. Studies in extracorporeal circulation. I. Applicability of Gibbon-type pump-oxygenator to human intracardiac surgery: 40 cases. Ann Surg. 1956;144:2-8.
10. Kirklin JW, Dushane JW, Patrick RT, Donald DE, Hetzel PS, Harshbarger HG, et al. Intracardiac surgery with the aid of a mechanical pump-oxygenator system (gibbon type): report of eight cases. Mayo Clin Proc. 1955;30:201-6.
11. Bucherl E. [Extracorporeal blood circulation with an artificial heart-lung system.]. Thoraxchirurgie. 1956;3:460-71.
12. Zenker R. [Details in the correction of heart defects with the aid of the heart-lung machine.]. Klin Med Osterr Z Wiss Prakt Med. 1961;16:169-76.
13. Zenker R, Heberer G. [Heart operations with the aid of a heart-lung machine.]. Langenbecks Arch Klin Chir Ver Dtsch Z Chir. 1959;292:359-71.

14. DeBakey ME. Left ventricular bypass pump for cardiac assistance. Clinical experience. *Am J Cardiol.* 1971;27:3-11.
15. DeBakey ME, Kennedy JH. Mechanical circulatory support: current status. *Am J Cardiol.* 1971;27:1-2.
16. Liotta D, Hall CW, Henly WS, Cooley DA, Crawford ES, DeBakey ME. Prolonged Assisted Circulation During and after Cardiac or Aortic Surgery. Prolonged Partial Left Ventricular Bypass by Means of Intracorporeal Circulation. *Am J Cardiol.* 1963;12:399-405.
17. Cooley DA. Heart substitution: transplantation and total artificial heart. The Texas Heart Institute experience. *Artif Organs.* 1985;9:12-6.
18. Zwischenberger JB, Steinhorn RH, Bartlett RH. *ECMO - Extracorporeal Cardiopulmonary Support in Critical Care*. Second Edition. ed Extracorporeal Life Support Organization; 2000.
19. Saito S, Nishinaka T. Chronic nonpulsatile blood flow is compatible with normal end-organ function: implications for LVAD development. *J Artif Organs.* 2005;8:143-8.
20. Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:1198-204.
21. Asimakopoulos G. Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion.* 1999;14:269-77.
22. Gourlay T. Biomaterial development for cardiopulmonary bypass. *Perfusion.* 2001;16:381-90.
23. Khosravi A, Skrabal CA, Westphal B, Kundt G, Greim B, Kunesch E, et al. Evaluation of coated oxygenators in cardiopulmonary-bypass systems and their impact on neurocognitive function. *Perfusion.* 2005;20:249-54.
24. Rubens FD. Cardiopulmonary bypass technology transfer: musings of a cardiac surgeon. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2002;13:485-99.
25. Skrabal CA, Khosravi A, Westphal B, Steinhoff G, Liebold A. Effects of poly-2-methoxyethylacrylate (PMEA)-coating on CPB circuits. *Scand Cardiovasc J.* 2006;40:224-9.
26. Aebert H, Kirchner S, Keyser A, Birnbaum DE, Holler E, Andreessen R, et al. Endothelial apoptosis is induced by serum of patients after cardiopulmonary bypass. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;18:589-93.
27. Bruins P, te Velthuis H, Eerenberg-Belmer AJ, Yazdanbakhsh AP, de Beaumont EM, Eijssman L, et al. Heparin-protamine complexes and C-reactive protein induce activation of the classical complement pathway: studies in patients undergoing cardiac surgery and in vitro. *Thromb Haemost.* 2000;84:237-43.
28. Chung JH, Gikakis N, Rao AK, Drake TA, Colman RW, Edmunds LH, Jr. Pericardial blood activates the extrinsic coagulation pathway during clinical cardiopulmonary bypass. *Circulation.* 1996;93:2014-8.



29. Skrabal CA, Khosravi A, Choi YH, Kaminski A, Westphal B, Steinhoff G, et al. Pericardial suction blood separation attenuates inflammatory response and hemolysis after cardiopulmonary bypass. *Scand Cardiovasc J*. 2006;40:219-23.
30. de Haan J, Boonstra PW, Monnink SH, Ebels T, van Oeveren W. Retransfusion of suctioned blood during cardiopulmonary bypass impairs hemostasis. *Ann Thorac Surg*. 1995;59:901-7.
31. Scholz M, Wimmer-Greinecker G, Simon A, Dzemali O, Chang HY, Kleine P, et al. Perioperative elastase activity in cardiac surgery and its role in endothelial leakage. *Inflamm Res*. 2003;52:433-8.
32. Boston US, Slater JM, Orszulak TA, Cook DJ. Hierarchy of regional oxygen delivery during cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2001;71:260-4.
33. Liam BL, Plochl W, Cook DJ, Orszulak TA, Daly RC. Hemodilution and whole body oxygen balance during normothermic cardiopulmonary bypass in dogs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115:1203-8.
34. Slater JM, Orszulak TA, Cook DJ. Distribution and hierarchy of regional blood flow during hypothermic cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:542-7.
35. Fromes Y, Gaillard D, Ponzio O, Chauffert M, Gerhardt MF, Deleuze P, et al. Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2002;22:527-33.
36. Vaislic C, Bical O, Farge C, Gaillard D, Ponzio O, Ollivier Y, et al. Totally minimized extracorporeal circulation: an important benefit for coronary artery bypass grafting in Jehovah's witnesses. *Heart Surg Forum*. 2003;6:307-10.
37. Wiesenack C, Liebold A, Philipp A, Ritzka M, Koppenberg J, Birnbaum DE, et al. Four years' experience with a miniaturized extracorporeal circulation system and its influence on clinical outcome. *Artif Organs*. 2004;28:1082-8.
38. Immer FF, Pirovino C, Gygax E, Englberger L, Tevæarai H, Carrel TP. Minimal versus conventional cardiopulmonary bypass: assessment of intraoperative myocardial damage in coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005;28:701-4.
39. van Boven WJ, Gerritsen WB, Waanders FG, Haas FJ, Aarts LP. Mini extracorporeal circuit for coronary artery bypass grafting: initial clinical and biochemical results: a comparison with conventional and off-pump coronary artery bypass grafts concerning global oxidative stress and alveolar function. *Perfusion*. 2004;19:239-46.
40. Aldea GS, Soltow LO, Chandler WL, Triggs CM, Vocelka CR, Crockett GI, et al. Limitation of thrombin generation, platelet activation, and inflammation by elimination of cardiotomy suction in patients undergoing coronary artery bypass grafting treated with heparin-bonded circuits. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;123:742-55.

41. Westerberg M, Bengtsson A, Jeppsson A. Coronary surgery without cardiectomy suction and autotransfusion reduces the postoperative systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:54-9.
42. De Servi S, Mariani M, Mariani G, Mazzone A. C-reactive protein increase in unstable coronary disease cause or effect? *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:1496-502.
43. Manginas A, Bei E, Chaidaroglou A, Degiannis D, Koniavitou K, Voudris V, et al. Peripheral levels of matrix metalloproteinase-9, interleukin-6, and C-reactive protein are elevated in patients with acute coronary syndromes: correlations with serum troponin I. *Clin Cardiol.* 2005;28:182-6.
44. Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, Bossi I, Ottini E, Vezzoli M, et al. Increased concentrations of inflammatory mediators in unstable angina: correlation with serum troponin T. *Heart.* 2001;85:571-5.
45. Nguyen DM, Gilfix BM, Dennis F, Blank D, Latter DA, Ergina PL, et al. Impact of transfusion of mediastinal shed blood on serum levels of cardiac enzymes. *Ann Thorac Surg.* 1996;62:109-14.
46. Gourlay T, Samartzis I, Taylor KM. The effect of haemodilution on blood-biomaterial contact-mediated CD11b expression on neutrophils: ex vivo studies. *Perfusion.* 2003;18:87-93.
47. Gourlay T, Samartzis I, Stefanou D, Taylor K. Inflammatory response of rat and human neutrophils exposed to di-(2-ethyl-hexyl)-phthalate-plasticized polyvinyl chloride. *Artif Organs.* 2003;27:256-60.
48. Gong J, Larsson R, Ekdahl KN, Mollnes TE, Nilsson U, Nilsson B. Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: both the biomaterial and the blood-gas phase interfaces induce complement activation in an in vitro model. *J Clin Immunol.* 1996;16:222-9.
49. Andersen KS, Nygreen EL, Grong K, Leirvaag B, Holmsen H. Comparison of the centrifugal and roller pump in elective coronary artery bypass surgery--a prospective, randomized study with special emphasis upon platelet activation. *Scand Cardiovasc J.* 2003;37:356-62.
50. Linneweber J, Chow TW, Kawamura M, Moake JL, Nose Y. In vitro comparison of blood pump induced platelet microaggregates between a centrifugal and roller pump during cardiopulmonary bypass. *Int J Artif Organs.* 2002;25:549-55.
51. Parolari A, Alamanni F, Naliato M, Spirito R, Franze V, Pompilio G, et al. Adult cardiac surgery outcomes: role of the pump type. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;18:575-82.
52. Skrabal CA, Steinhoff G, Liebold A. Minimizing cardiopulmonary bypass attenuates myocardial damage after cardiac surgery. *Asaio J.* 2007;53:32-5.
53. Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol.* 2000;65:215-20.
54. Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells and vasculitis. *Intern Med.* 2004;43:660-7.

55. McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, et al. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c. *Diabetologia*. 2005;48:345-50.
56. Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*. 1999;93:2951-8.
57. Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, et al. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation*. 2003;76:1-4.
58. Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, Wrzesien-Kus A, Pluta A, Cebula B, et al. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol*. 2005;75:492-7.
59. Woywodt A, Goldberg C, Scheer J, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells. *Ann Hematol*. 2004;83:491-4.
60. Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet*. 2003;361:206-10.
61. Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med*. 1997;337:1584-90.
62. Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17:1728-30.
63. Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GY. Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation*. 2004;110:1794-8.
64. Scholz M, Nowak P, Blaheta R, Schuller A, Menon S, Cinatl J, et al. Relocalization of endothelial cell beta-catenin after coculture with activated neutrophils from patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Invest Surg*. 2004;17:143-9.
65. Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Frances V, et al. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens*. 1996;48:531-9.
66. Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation. *Circulation*. 2003;107:3141-5.
67. Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid

- artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet*. 1999;353:1729-34.
68. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 1998;339:321-8.
69. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Mabuchi N, Hayashi M, et al. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortality in patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with plasma angiotensin II and endothelin-1. *Eur Heart J*. 1999;20:1799-807.
70. Bettencourt P, Ferreira A, Dias P, Castro A, Martins L, Cerqueira-Gomes M. Evaluation of brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure. *Cardiology*. 2000;93:19-25.
71. Dao Q, Krishnaswamy P, Kazanegra R, Harrison A, Amirnovin R, Lenert L, et al. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:379-85.
72. Maisel A. B-type natriuretic peptide levels: a potential novel "white count" for congestive heart failure. *J Card Fail*. 2001;7:183-93.
73. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med*. 1995;333:356-63.
74. Sam F, Colucci WS. Role of endothelin-1 in myocardial failure. *Proc Assoc Am Physicians*. 1999;111:417-22.
75. Wei CM, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Brandt RR, Wright S, et al. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation*. 1994;89:1580-6.
76. Frey B, Pacher R, Locker G, Bojic A, Hartter E, Woloszczuk W, et al. Prognostic value of hemodynamic vs big endothelin measurements during long-term IV therapy in advanced heart failure patients. *Chest*. 2000;117:1713-9.
77. James KB, McCarthy PM, Thomas JD, Vargo R, Hobbs RE, Sapp S, et al. Effect of the implantable left ventricular assist device on neuroendocrine activation in heart failure. *Circulation*. 1995;92:II191-5.
78. Delgado RM, 3rd, Willerson JT. Pathophysiology of heart failure: a look at the future. *Tex Heart Inst J*. 1999;26:28-33.
79. Akgul A, Skrabal CA, Thompson LO, Loebe M, Lafuente JA, Noon GP, et al. Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23:709-15.
80. Bruckner BA, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Youker KA, Radovancevic B, Connelly JH, et al. Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:457-464.
81. Sodian R, Loebe M, Schmitt C, Potapov EV, Siniawski H, Muller J, et al. Decreased plasma concentration of brain natriuretic peptide as a potential indicator of cardiac recovery in patients supported by mechanical circulatory assist systems. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:1942-9.

82. Milting H, A E-B, Kassner A, Fey O, Sarnowski P, Arusoglu L, et al. The time course of natriuretic hormones as plasma markers of myocardial recovery in heart transplant candidates during ventricular assist device support reveals differences among device types. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:949-55.
83. van Wamel AJ, Ruwhof C, van der Valk-Kokshoom LE, Schrier PI, van der Laarse A. The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol Cell Biochem*. 2001;218:113-24.
84. Boscoe MJ, Goodwin AT, Amrani M, Yacoub MH. Endothelins and the lung. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000;32:41-62.
85. Cody RJ, Haas GJ, Binkley PF, Capers Q, Kelley R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation*. 1992;85:504-9.
86. Fujii T, Otsuka T, Tanaka S, Kanazawa H, Hirata K, Kohno M, et al. Plasma endothelin-1 level in chronic obstructive pulmonary disease: relationship with natriuretic peptide. *Respiration*. 1999;66:212-9.
87. Liang F, Lu S, Gardner DG. Endothelin-dependent and -independent components of strain-activated brain natriuretic peptide gene transcription require extracellular signal regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension*. 2000;35:188-92.
88. Harada M, Itoh H, Nakagawa O, Ogawa Y, Miyamoto Y, Kuwahara K, et al. Significance of ventricular myocytes and nonmyocytes interaction during cardiocyte hypertrophy: evidence for endothelin-1 as a paracrine hypertrophic factor from cardiac nonmyocytes. *Circulation*. 1997;96:3737-44.
89. Levin HR, Oz MC, Chen JM, Packer M, Rose EA, Burkhoff D. Reversal of chronic ventricular dilation in patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading. *Circulation*. 1995;91:2717-2720.
90. Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, Lafuente JA, Roberts RR, Akgul A, et al. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. *J Surg Res*. 2005;123:25-32.
91. Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing--active participants or innocent bystanders? *Wound Repair Regen*. 1999;8:1-16.
92. Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucl Acids Res*. 2000;28:45-48.
93. Irani AM, Schwartz LB. Human mast cell heterogeneity. *Immunol Rev*. 1994;15:303-308.
94. de Almeida A, Mustin D, Forman MF, Brower GL, Janicki JS, Carver W. Effects of mast cells on the behavior of isolated heart fibroblasts: modulation of collagen remodeling and gene expression. *Am J Physiol*. 2002;191:51-59.

95. Brower GL, Chancey AL, Thanigaraj S, Matsubara BB, Janicki JS. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H518-25.
96. Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF. Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. 1997;272:7127-7131.
97. Detillieux KA, Sheikh F, Kardami E, Cattini PA. Biological activities of fibroblast growth factor-2 in the adult myocardium. *Cardiovasc Res*. 2003;57:8-19.
98. Kardami E, Jiang ZS, Jimenez SK, Hirst CJ, Sheikh F, Zahradka P, et al. Fibroblast growth factor 2 isoforms and cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2004;63:458-66.
99. Walgenbach KJ, Gorospe JR, Gratas C, Brunagel G, Hoffman EP, Shestak KC. A Potential Role for Mast Cells in the of bFGF From Normal Myocytes During Angiogenesis In Vivo. 2002;15:153-162.
100. Bruckner BA, Stetson SJ, Farmer JA, Radovancevic B, Frazier OH, Noon GP, et al. The implications for cardiac recovery of left ventricular assist device support on myocardial collagen content. *Am J Surg*. 2000;180:498-501.
101. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. 1991;83:1849-1865.
102. Gruber BL, Kew RR, Jelaska A, Marchese MJ, Garlick J, Ren S, et al. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. 1997;158:2310-2317.
103. Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. 2001;12:1668-1676.
104. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. 1997;61:233-245.
105. Caughey GH. Serine proteinases of mast cell and leukocyte granules. A league of their own. 1994;150:S138-S142.
106. Caughey GH, Raymond WW, Wolters PJ. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1480:245-257.
107. Chandrasekharan UM, Sanker S, Glynias MJ, Karnik SS, Husain A. Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. *Science*. 1996;271:502-505.
108. Bernasconi P, Di Blasi C, Mora M, Morandi L, Galbiati S, Confalonieri P, et al. Transforming growth factor-beta1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. 1999;9:28-33.
109. Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. 1994;269:18134-18140.

110. Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, Fang KC. Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase. 2001;166:2783-2792.
111. Seiler G, Welle M, Busato A, Lin S, Gaschen FP. Mast cell proliferation and alterations in bFGF amount and localization are involved in the response of muscle to dystrophin deficiency in hypertrophic feline dystrophy. 2001;11:56-71.
112. Satoh M, Hirayoshi K, Yokota S, Hosokawa N, Nagata K. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. J Cell Biol. 1996;133:469-83.
113. Puxeddu I, Piliponsky AM, Bachelet I, Levi-Schaffer F. Mast cells in allergy and beyond. Int J Biochem Cell Biol. 2003;35:1601-7.
114. Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. Mast cells. Physiol Rev. 1997;77:1033-1079.
115. Gruber BL, Marchese MJ, Suzuki K, Schwartz LB, Okada Y, Nagase H, et al. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. J Clin Invest. 1989;84:1657-1662.
116. Stack MS, Johnson DA. Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). J Biol Chem. 1994;269:9416-9.
117. Suzuki K, Lees M, Newlands GF, Nagase H, Woolley DE. Activation of precursors for matrix metalloproteinases 1 (interstitial collagenase) and 3 (stromelysin) by rat mast-cell proteinases I and II. Biochem J. 1995;305 (Pt 1):301-306.
118. Chancey AL, Brower GL, Janicki JS. Cardiac mast cell-mediated activation of gelatinase and alteration of ventricular diastolic function. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2002;282:H2152-8.
119. Kielty CM, Lees M, Shuttleworth CA, Woolley D. Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. Biochem Biophys Res Commun. 1993;191:1230-6.
120. Fajardo I, Pejler G. Human Mast Cell beta-Tryptase Is a Gelatinase. J Immunol. 2003;171:1493-9.
121. Takeda K, Kusachi S, Ohnishi H, Nakahama M, Murakami M, Komatsubara I, et al. Greater than normal expression of the collagen-binding stress protein heat-shock protein-47 in the infarct zone in rats after experimentally-induced myocardial infarction. Coron Artery Dis. 2000;11:57-68.
122. Abu-Omar Y, Ratnatunga C. Cardiopulmonary bypass and renal injury. Perfusion. 2006;21:209-13.
123. Bolcal C, Iyem H, Sargin M, Mataraci I, Sahin MA, Temizkan V, et al. Gastrointestinal complications after cardiopulmonary bypass: sixteen years of experience. Can J Gastroenterol. 2005;19:613-7.

124. Christenson JT, Schmuziger M, Maurice J, Simonet F, Velebit V. Gastrointestinal complications after coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108:899-906.
125. Murphy GJ, Angelini GD. Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality? *J Card Surg.* 2004;19:481-8.
126. Ng CS, Wan S, Yim AP, Arifi AA. Pulmonary dysfunction after cardiac surgery. *Chest.* 2002;121:1269-77.
127. Westaby S. Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med.* 1987;13:89-95.
128. Mathru M, Solanki DR, Woodson LC, Funston JS, Ozkan O, Henkel SN, et al. Splanchnic oxygen consumption is impaired during severe acute normovolemic anemia in anesthetized humans. *Anesthesiology.* 2006;105:37-44.
129. Morariu AM, Maathuis MH, Asgeirsdottir SA, Leuvenink HG, Boonstra PW, van Oeveren W, et al. Acute isovolemic hemodilution triggers proinflammatory and procoagulatory endothelial activation in vital organs: role of erythrocyte aggregation. *Microcirculation.* 2006;13:397-409.
130. Rodriguez-Castro D, Farrero E, Javierre C, Carrio ML, Diaz-Prieto A, Valero J, et al. Troponin repercussion of defibrillation at the end of cardiopulmonary bypass. *J Card Surg.* 2007;22:192-4.
131. Vikenes K, Omvik P, Farstad M, Nordrehaug JE. Cardiac biochemical markers after cardioversion of atrial fibrillation or atrial flutter. *Am Heart J.* 2000;140:690-6.
132. Stevenson LW. Clinical use of inotropic therapy for heart failure: looking backward or forward? Part II: chronic inotropic therapy. *Circulation.* 2003;108:492-7.
133. Lucas C, Johnson W, Hamilton MA, Fonarow GC, Woo MA, Flavell CM, et al. Freedom from congestion predicts good survival despite previous class IV symptoms of heart failure. *Am Heart J.* 2000;140:840-7.
134. Skrabal CA, Thompson LO, Southard RE, Joyce DL, Noon GP, Loebe M, et al. Interaction between isolated human myocardial mast cells and cultured fibroblasts. *J Surg Res.* 2004;118:66-70.
135. Dandel M, Weng Y, Siniawski H, Potapov E, Lehmkuhl HB, Hetzer R. Long-term results in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy after weaning from left ventricular assist devices. *Circulation.* 2005;112:137-45.



## 6. Abkürzungen

ACT	Activated Clotting Time	Hkt	Hämatokrit
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor, alt. FGF-2	HLM	Herz-Lungen-Maschine
BiVAD	Biventrikular Assist Device	HSP-47	Heat Shock Protein-47
BNP	B-type Natriuretic Peptide	HZV	Herz-Zeit-Volumen
CD 146	Cluster of Differentiation 146	ICM	Ischemic Cardiomyopathy
CEC	Circulating Endothelial Cell	IgG	Immunglobulin G
CK	Creatinkinase	KHK	Koronare Herzkrankheit
CKMB	Creatinkinase Isoenzym MB	LVAD	Left Ventricular Assist Device
Cy3	Cyanine 3	LVEDD	Left Ventricular Enddiastolic Diameter
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindole	MECC	Minimal Extracorporeal Circulation
DCM	Dilated Cardiomyopathy	MMP-1,...	Matrix Metalloproteinase-1,...
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	RVAD	Right Ventrikular Assist Device
DNA	Deoxyribonucleic Acid	SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
DO <sub>2</sub>	Delivery of Oxygen	sTm	soluble Thrombomodulin
ECMO	Extracorporeal Membrane Oxygenation	TAH	Total Artificial Heart
EF	Ejection Fraction	TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
EKZ	Extrakorporale Zirkulation	TIMP-1,...	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1,...
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay	TnT	Troponin T
ET-1	Endothelin-1	Tris-HCL	Tris-Hydrochloride
FDA	Food and Drug Administration	VAD	Ventricular Assist Device
FITC	Fluorescein-5-Isothiocyanate	vWF	von Willebrand Factor
<sup>3</sup> H	Tritium		
Hb	Hämoglobin		
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution		

## **Anhang**

- I.     Publikationen
- II.    Selbständigkeitserklärung
- III.   Curriculum Vitae
- IV.   Danksagung

## **I. Publikationen**

- Publikation 1: Skrabal CA, Steinhoff G, Liebold A. Minimizing cardiopulmonary bypass attenuates myocardial damage after cardiac surgery. *Asaio J.* 2007;53:32-5.
- Publikation 2: Skrabal CA, Choi YH, Kaminski A, Steiner M, Kundt G, Steinhoff G, Liebold A. Circulating endothelial cells demonstrate an attenuation of endothelial damage by minimizing the extracorporeal circulation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006; 132: 291-6.
- Publikation 3: Thompson LO, Skrabal CA, Loebe M, Lafuente JA, Roberts RR, Akgul A, et al. Plasma neurohormone levels correlate with left ventricular functional and morphological improvement in LVAD patients. *J Surg Res.* 2005;123:25-32.
- Publikation 4: Akgul A, Skrabal CA, Thompson LO, Loebe M, Lafuente JA, Noon GP, et al. Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support. *J Heart Lung Transplant.* 2004; 23: 709-15.
- Publikation 5: Skrabal CA, Thompson LO, Southard RE, Joyce DL, Noon GP, Loebe M, et al. Interaction between isolated human myocardial mast cells and cultured fibroblasts. *J Surg Res.* 2004; 118: 66-70.

# Minimizing Cardiopulmonary Bypass Attenuates Myocardial Damage After Cardiac Surgery

CHRISTIAN A. SKRABAL, GUSTAV STEINHOFF, AND ANDREAS LIEBOLD

The standard heart-lung machine is deemed a major trigger of systemic inflammatory reactions, potentially inducing organ failure. The strict reduction of blood–artificial surface and blood–air contact might represent meaningful improvements of the extracorporeal technology with respect to organ preservation. In this study, we assessed perioperative myocardial damage by using a novel minimal extracorporeal circuit (MECC) and a conventional cardiopulmonary bypass (CPB) system.

Sixty patients scheduled for coronary artery bypass surgery were randomly assigned to either the MECC or the standard CPB system. Myocardial markers were determined by specific immunoassays 6, 12, and 24 hours after CPB initiation. Results were corrected for hemodilution.

Demographics, hemodynamics, the number of anastomoses, CPB, and cross-clamp time were comparable between the groups. MECC patients demonstrated significantly lower levels of Troponin T (ng/ml) at 6, 12, and 24 hours ( $0.07 \pm 0.01$  vs.  $0.16 \pm 0.04$ ,  $p < 0.005$ ;  $0.12 \pm 0.03$  vs.  $0.28 \pm 0.08$ ,  $p < 0.008$ ;  $0.21 \pm 0.05$  vs.  $0.35 \pm 0.09$ ,  $p < 0.03$ , respectively) and creatine kinase-MB (U/l) at 6 and 12 hours ( $22.5 \pm 1.5$  vs.  $40.6 \pm 3.3$ ,  $p < 0.0001$ ;  $23.3 \pm 3.4$  vs.  $40.8 \pm 8.0$ ,  $p < 0.001$ , respectively). Creatine kinase-MB at 24 hours tended to lower values in the MECC group but did not quite reach statistical significance.

The MECC system may not only provide a less invasive solution to meet the requirements during cardiac surgery but also a more organ-preserving alternative to standard CPB. *ASAIO Journal* 2007; 53:32-35.

On May 6, 1953, Dr. John Gibbon performed his first successful operation using a mechanical heart and lung apparatus on a 18-year-old woman with a large atrial septal defect.<sup>1</sup> Since then, cardiopulmonary bypass (CPB) has progressed through pioneering and development and is now in a refinement process in which clinicians and researchers collaborate to further improve its elaborated technology. Still, a drawback is the interaction between blood components and the artificial surfaces of the heart-lung machine that is, at least to some

extent, responsible for an inappropriate inflammation affecting the whole body also known as systemic inflammatory response syndrome.<sup>2,3</sup> The clinical manifestation of this inflammatory response varies, but in some patients, it can be fatal. The most effective approach to prevent these biomaterial-mediated complications is to strictly avoid CPB whenever possible. Off-pump surgery (OPCAB) is booming since the 1990s, with encouraging results. Early reports suggested better preservation of the left ventricular contractility and a lower incidence of perioperative infarction than when cardiac arrest was established.<sup>4,5</sup> A recent publication confirmed that OPCAB surgery is less damaging to the myocardium but also demonstrated explicitly that the graft-patency rate was significantly lower at 3 months in the off-pump group than in the on-pump group and that this difference might have implications with respect to the long-term outcome.<sup>6</sup> Yet, conventional “on-pump” coronary artery bypass graft surgery (CABG) carries two main risks: The CPB is primarily responsible for the above-mentioned systemic inflammation, and ischemia during aortic cross-clamping results in myocardial damage.<sup>2,7</sup> Recently, several new CPB concepts were developed, targeting the strict reduction of artificial surface area, blood–air interface, and the optimization of surface coating. The minimal extracorporeal circuit (MECC) is one of those systems successfully used in our institution. In the present study, we investigated the effect of different CPB concepts on myocardial tissue injury in patients undergoing CABG.

## Materials and Methods

The study was approved by the local ethics committee. Sixty patients scheduled for elective CABG were prospectively, randomly assigned into two groups of 30 patients each, according to the type of CPB used. Surgeons were randomly assigned to the cases without reference to either CPB. For standard CPB, a microporous membrane oxygenator (Jostra Quadrox, Maquet Cardiopulmonary AG, Hirrlingen, Germany) with cardiectomy suction reservoir was used with a roller pump (Jostra HL 20, Maquet Cardiopulmonary AG). The MECC system introduces a new diffusion membrane oxygenator (Jostra Quadrox D, Maquet Cardiopulmonary AG) and a centrifugal pump (Jostra RotaFlow, Maquet Cardiopulmonary AG); fundamental components are reduced to minimal elements as arterial and venous lines are completely omitted as the cardiectomy reservoir. As a consequence, the required priming volume is different: Whereas the standard CPB circuits were filled with 1000 ml of colloid solution and 500 ml of crystalloid solution, the MECC systems were primed with 500 ml of crystalloid solution only.

From the University of Rostock, Department of Cardiac Surgery, Schillingallee 35, 18057 Rostock, Germany.

Submitted for consideration April 2006; accepted for publication in revised form August 2006.

Reprint requests: Dr. Christian Skrabal, Department of Cardiac Surgery, University of Rostock, Schillingallee 35, D-18057 Rostock, Germany.

DOI: 10.1097/01.mat.0000249868.96923.1e

**Table 1. Patients Demographics and Perioperative Data**

	Standard-CPB	MECC	<i>p</i> value
Total (n)	30	30	
Age (years)	63.8 ± 1.7	65.8 ± 2.2	0.487
BSA	2.00 ± 0.04	1.91 ± 0.03	0.077
Preop EF	63.1 ± 2.8	57.0 ± 3.5	0.180
Grafts	3.8 ± 0.15	3.6 ± 0.15	0.439
Cross-clamp time (min)	49.5 ± 2.87	52.32 ± 2.58	0.472
CPB time (min)	92.1 ± 4.3	85.5 ± 3.4	0.234
Inotropic support (- 6 h)	8 (26.7%)	8 (26.7%)	1.0
24-h blood-loss (ml)	327 ± 46	222 ± 23	0.048
ICU stay (days)	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.0	0.304

Both systems were heparin-coated and ensured a nonpulsatile flow of 2.0 to 2.5 l/min m<sup>2</sup> body surface area. No arterial line filtration was applied.

#### Anesthesia

Anesthesia was induced with 1 µg/kg sufentanil, 0.2 mg/kg etomidate, 0.04 mg/kg midazolam, and 0.15 mg/kg cisatracurium. Anesthesia was maintained with sufentanil, totaling 1 µg/kg per hour, and midazolam, 0.1 mg/kg per hour; supplemental sevoflurane until CPB was installed. No volatile drugs were added during CPB.

#### Operation

Patients received 200 to 350 IU/kg heparin for systemic anticoagulation. Target activated coagulation time was aimed at 250 seconds in the MECC setup and at 400 seconds in the standard CPB. Supplemental doses were administered if necessary to maintain this target activated coagulation time. The arterial cannula was placed in the ascending aorta; the venous two-stage cannula was placed in the right atrium. Lines were connected with due diligence to avoid gaseous bubbles. Myocardial protection was achieved by antegrade administration of Calafiore blood cardioplegia. Mild hypothermia (31 to 32.5°C) was instituted immediately after CPB initiation. Low-dose aprotinin (1 × 10<sup>6</sup> IU) was administered in the CPB priming solution. Additionally, the anesthesiologist applied 1 × 10<sup>6</sup> IU aprotinin per hour of CPB time. The aorta was cross-clamped while the distal anastomoses were completed. The proximal vein anastomoses were established with partial occlusion of the ascending aorta while the patient was rewarmed. Blood from the surgical site was collected in the cardiectomy reservoir in the standard CPB group or in a cell-saving device in the MECC group. After CPB, protamine (1 mg/100 units of total heparin) was administered to antagonize heparin.

#### Samples and Endothelial Markers

Analysis was performed 6, 12, and 24 hours after CPB initiation. Blood was collected into microtainers with lithium heparin, centrifuged at 3345 × g for 15 minutes, and supernatant was frozen at -70°C for batch analysis. Creatine kinase-MB (CKMB, mass) and Troponin T were measured by electrochemiluminescence technique (Elecys 2010, Roche Grenzach-Wyhlen, Germany).

#### Statistical Analysis

Results are expressed as mean ± standard error of mean (SEM). Normal distribution was tested by the Kolmogorov-Smirnov test. The two-tailed Student *t* test for paired samples was used to analyze differences between paired measurements of each patient, for unpaired samples to analyze differences in corresponding data between the groups. If data were not normally distributed (CKMB, Troponin T), nonparametric tests were used for statistical purposes. Differences between the groups in corresponding measurements were analyzed by use of the Mann-Whitney *U* test. The Wilcoxon matched pairs test was used for analysis of measurements for each patient over time. All data analyses were performed with the use of SPSS version 11.0 (SPSS, Inc., Chicago IL). Generally, a value of *p* < 0.05 was considered to indicate statistical significance.

#### Results

Demographics and perioperative clinical data of our patients are listed in **Table 1**. There was no statistical difference between the groups regarding age, body surface area, preoperative ejection fraction, cross-clamp duration, CPB time, number of grafts, need for inotropic support, and intensive care unit stay. The perioperative and in-hospital mortality rate was 0%, and postoperative recovery was uneventful for all patients. Interestingly, the 24-hour blood loss was significantly higher in the standard CPB than in the MECC group (*p* < 0.05).

#### Hemodilution/Hematocrit

Preoperative hematocrit values were significantly higher in the standard CPB group compared with the MECC group (41% ± 0.5% vs. 39% ± 0.7%, *p* < 0.0045). During CPB, hematocrit decreased significantly in all patients compared with baseline values (*p* < 0.0001). The use of the MECC system resulted in a minor hemodilution, with a decrease in hematocrit of 8.9% ± 0.6% vs. 11.3% ± 0.5% (*p* < 0.005) immediately after surgery as well as at 12 hours and 24 hours after CPB initiation (6.9% ± 0.6% vs. 9.8% ± 0.6%, *p* < 0.002; 7.9% ± 0.5% vs. 10.6% ± 0.6%, *p* < 0.002, respectively) (**Figure 1**).

#### Myocardial Marker

Postoperative Troponin T (ng/ml) was significantly lower in the MECC group at 6, 12, and 24 hours after CPB initiation (0.07 ± 0.01 vs. 0.16 ± 0.04, *p* < 0.005; 0.12 ± 0.03 vs. 0.28 ± 0.08, *p* < 0.008; 0.21 ± 0.05 vs. 0.35 ± 0.09, *p* <

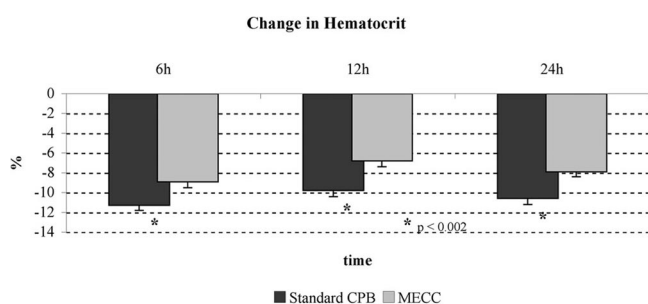


Figure 1. Differences in hematocrit.

0.03, respectively). Also, postoperative CKMB (U/l) levels at 6 and 12 hours were less elevated with MECC compared with standard CPB ( $22.5 \pm 1.5$  vs.  $40.6 \pm 3.3$ ,  $p < 0.0001$ ;  $23.3 \pm 3.4$  vs.  $40.8 \pm 8.0$ ,  $p < 0.001$ , respectively). At 24 hours, CKMB tended to lower values in the MECC group, but differences were not quite statistically significant. Results are presented in Figure 2.

### Discussion

This study was designed to further investigate the myocardial damage that occurs during CABG surgery. We hypothesized that not only the surgical procedure and the ischemia/reperfusion injury during and after aortic cross-clamping but also the heart-lung machine itself contributes to myocardial necrosis. We further assumed that a minimized CPB system would benefit myocardial preservation. Meanwhile, quite a few mini-CPB systems are on the market, but the common breakthrough is still outstanding. Even if there are fewer components in a mini-CPB, the lower output figures make the system currently more expensive than a standard system.

The MECC system that we used is one of the vanguards in mini-CPB. Fromes *et al.*<sup>8</sup> were some of the first investigators to report their experiences with MECC. Their efforts concentrated on the inflammatory alterations, and they detected lower levels of Interleukin-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and polymorphonuclear elastase when using MECC compared with standard CPB. A recent study using CorX, another novel miniaturized system provided by CardioVent Inc. (Santa Clara, CA), delivered similar results.<sup>9</sup> Vaislic *et al.*<sup>10</sup> emphasized the clinical usability of MECC, as they used it successfully in 40 Jehovah's Witnesses, primarily to save blood. In an earlier retrospective study, we reported fewer postoperative complications when using MECC, including less myocardial infarction.<sup>11</sup> The set-

up-dependent myocardial injury during CPB was further investigated in a recent publication by Immer *et al.*<sup>12</sup> During surgery, they analyzed myocardial plasma markers and detected reduced myocardial injury when using MECC. Even if similar to our present study at first glance, both studies differ in some aspects. Immer *et al.* performed a prospective, nonrandomized study in that cardioplegia was administered one time in the MECC but repeatedly every 20 to 30 minutes in the standard CPB group, and "hot shot" was given when standard CPB was used. In our prospective, randomized approach, Calafiore blood cardioplegia administration was alike in both groups, but hot shot was not given in either group. Other differences concern technical features, as we did not use the Cardiosmart suction device nor an ultrasound probe to detect air in the venous line. Nevertheless, the results are very comparable, so that differences between both setups seem not to be determining. The overall higher myocardial marker range in both of our groups might issue from the correction for hematocrit that we performed to exclude dilution errors. Van Boven *et al.*<sup>13</sup> undertook a more general assessment of organ damage. They measured oxidative stress parameters that indicated a better global organ preservation when using MECC compared with standard CPB. Speculations as to why the MECC system is more organ preserving and, as our results show, less damaging to the myocardium, require the further analysis of both setups. Patient demographics and perioperative data were similar in both experimental groups, including surgeons and surgical techniques, number of grafts, and transient ischemia during aortic clamping. In search of methodical differences, the use of cardiomy suction might be decisive because retransfusion of pericardial suction blood is deemed to be an important trigger of inappropriate inflammation.<sup>14,15</sup> Myocardial injury may be directly associated with this inflammatory activity.<sup>16–18</sup> Differentially from this pathway, pericardial suction blood itself contains high levels of CK and CKMB, especially when the internal mammary artery was dissected and used for bypass. In the case of retransfusion, these enzymes reach circulation and elevate the systemic concentration.<sup>19</sup>

Further modifications concern the reduced artificial surface and the decreased need in priming volume resulting in lower hemodilution. Gourlay *et al.*<sup>20</sup> demonstrated that neutrophil activation increases proportional to the artificial surface area but in inverse proportion to the hematocrit. The cardiomy suction reservoir reinforces the inflammatory response not only by its additional artificial surface but also by introduction of a blood-air interface.<sup>21</sup>

Finally, the pump type might also influence the blood cell homeostasis. Several studies could reveal advantages of centrifugal over roller pumps concerning red blood cell preservation and platelet activation.<sup>22–24</sup>

However, in the present study, we compared the CPB systems as whole units, knowing that the influence of each component requires further analysis. In this prospective, randomized study, the minimized CPB system used routinely in our institution revealed significant benefits with respect to myocardial preservation during CABG. The renunciation of cardiomy suction and the reduced artificial surface area might be the key features of the mini-setup making it less harmful than a standard CPB.

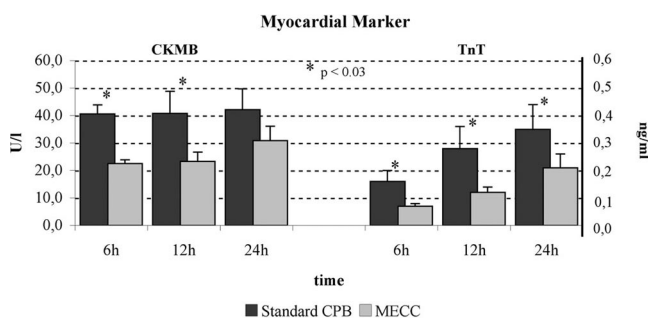


Figure 2. Myocardial marker.



## References

- Gibbon JH Jr: Application of a mechanical heart and lung apparatus to cardiac surgery. *Minn Med* 37: 171–185; 1954.
- Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, *et al*: Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg* 69: 1198–1204, 2000.
- Asimakopoulos G: Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion* 14: 269–277, 1999.
- Akins CW, Boucher CA, Pohost GM: Preservation of interventricular septal function in patients having coronary artery bypass grafts without cardiopulmonary bypass. *Am Heart J* 107: 304–309, 1984.
- Benetti FJ, Naselli G, Wood M, Geffner L: Direct myocardial revascularization without extracorporeal circulation: experience in 700 patients. *Chest* 100: 312–316, 1991.
- Khan NE, De Souza A, Mister R, *et al*: A randomized comparison of off-pump and on-pump multivessel coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med* 350: 21–28, 2004.
- Taggart DP: Biochemical assessment of myocardial injury after cardiac surgery: effects of a platelet activating factor antagonist, bilateral internal thoracic artery grafts, and coronary endarterectomy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 120: 651–659, 2000.
- Fromes Y, Gaillard D, Ponzio O, *et al*: Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg* 22: 527–533, 2002.
- Abdel-Rahman U, Ozaslan F, Risteski PS, *et al*: Initial experience with a minimized extracorporeal bypass system: is there a clinical benefit? *Ann Thorac Surg* 80: 238–243, 2005.
- Vaislic C, Bical O, Farge C, *et al*: Totally minimized extracorporeal circulation: an important benefit for coronary artery bypass grafting in Jehovah's Witnesses. *Heart Surg Forum* 6: 307–310, 2003.
- Wiesenack C, Liebold A, Philipp A, *et al*: Four years' experience with a miniaturized extracorporeal circulation system and its influence on clinical outcome. *Artif Organs* 28: 1082–1088, 2004.
- Immer FF, Pirovino C, Gyax E, *et al*: Minimal versus conventional cardiopulmonary bypass: assessment of intraoperative myocardial damage in coronary bypass surgery. *Eur J Cardiothorac Surg* 28: 701–704, 2005.
- van Boven WJ, Gerritsen WB, Waanders FG, *et al*: Mini extracorporeal circuit for coronary artery bypass grafting: initial clinical and biochemical results: a comparison with conventional and off-pump coronary artery bypass grafts concerning global oxidative stress and alveolar function. *Perfusion* 19: 239–246, 2004.
- Aldea GS, Soltow LO, Chandler WL, *et al*: Limitation of thrombin generation, platelet activation, and inflammation by elimination of cardiomy suction in patients undergoing coronary artery bypass grafting treated with heparin-bonded circuits. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 742–755, 2002.
- Westerberg M, Bengtsson A, Jeppsson A: Coronary surgery without cardiomy suction and autotransfusion reduces the post-operative systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg* 78: 54–59, 2004.
- Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, *et al*: Increased concentrations of inflammatory mediators in unstable angina: correlation with serum troponin T. *Heart* 85: 571–575, 2001.
- De Servi S, Mariani M, Mariani G, Mazzone A: C-reactive protein increase in unstable coronary disease cause or effect? *J Am Coll Cardiol* 46: 1496–1502, 2005.
- Manginas A, Bei E, Chaidaroglou A, *et al*: Peripheral levels of matrix metalloproteinase-9, interleukin-6, and C-reactive protein are elevated in patients with acute coronary syndromes: correlations with serum troponin I. *Clin Cardiol* 28: 182–186, 2005.
- Nguyen DM, Gilfix BM, Dennis F, *et al*: Impact of transfusion of mediastinal shed blood on serum levels of cardiac enzymes. *Ann Thorac Surg* 62: 109–114, 1996.
- Gourlay T, Samartzis I, Taylor KM: The effect of haemodilution on blood-biomaterial contact-mediated CD11b expression on neutrophils: ex vivo studies. *Perfusion* 18: 87–93, 2003.
- Gong J, Larsson R, Ekdahl KN, *et al*: Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: both the biomaterial and the blood-gas phase interfaces induce complement activation in an in vitro model. *J Clin Immunol* 16: 222–229, 1996.
- Andersen KS, Nygreen EL, Grong K, *et al*: Comparison of the centrifugal and roller pump in elective coronary artery bypass surgery: a prospective, randomized study with special emphasis upon platelet activation. *Scand Cardiovasc J* 37: 356–362, 2003.
- Linneweber J, Chow TW, Kawamura M, *et al*: In vitro comparison of blood pump induced platelet microaggregates between a centrifugal and roller pump during cardiopulmonary bypass. *Int J Artif Organs* 25: 549–555, 2002.
- Parolari A, Alamanni F, Naliato M, *et al*: Adult cardiac surgery outcomes: role of the pump type. *Eur J Cardiothorac Surg* 18: 575–582, 2000.

# Circulating endothelial cells demonstrate an attenuation of endothelial damage by minimizing the extracorporeal circulation

Christian A. Skrabal, MD,<sup>a</sup> Yeong H. Choi, MD,<sup>a</sup> Alexander Kaminski, MD,<sup>a</sup> Michael Steiner, MD,<sup>b</sup> Guenther Kundt, PhD,<sup>c</sup> Gustav Steinhoff, MD, PhD,<sup>a</sup> and Andreas Liebold, MD, PhD<sup>a</sup>

**Objective:** Detachment of endothelial cells may represent serious injury of the endothelium after cardiopulmonary bypass. We investigated whether the extent of endothelial injury is related to the type of cardiopulmonary bypass system used (conventional or minimized) and determined circulating endothelial cells as well as von Willebrand factor and soluble thrombomodulin.

**Methods:** Twenty patients scheduled for elective coronary bypass grafting were randomly assigned to either the minimal extracorporeal circulation system or the standard cardiopulmonary bypass. Ten healthy volunteers served as controls. Circulating endothelial cells per milliliter of full blood were perioperatively determined by immunomagnetic cell separation technique. Endothelial plasma markers were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results:** Preoperative circulating endothelial cell numbers did not differ between the experimental groups, but were significantly higher than in the healthy controls ( $18.6 \pm 5.6$  vs  $7.2 \pm 3.8$ ,  $P < .001$ ). At 6 hours, circulating endothelial cell numbers increased significantly compared with baseline in both experimental groups and peaked at 12 hours after cardiopulmonary bypass initiation, each time with significantly lower values in the minimal extracorporeal circulation group (6 hours:  $44.0 \pm 9.9$  vs  $29.6 \pm 9.8$ ,  $P = .007$ ; 12 hours:  $48.1 \pm 6.8$  vs  $31.8 \pm 7.1$ ,  $P < .001$ ). Likewise, von Willebrand factor and soluble thrombomodulin postoperatively increased in both groups with a tendency toward lower levels in the minimal extracorporeal circulation group. Although circulating endothelial cells gradually declined, continually with lower numbers in the minimal extracorporeal circulation group, the endothelial plasma markers remained elevated during observation time.

**Conclusions:** Circulating endothelial cells represent a novel marker of the intrinsic endothelial damage caused by cardiopulmonary bypass. Its analysis facilitates the evaluation of cardiopulmonary bypass modifications as the minimal extracorporeal circulation system could be proven to be less injurious to endothelium and myocardium.

From the Department of Cardiac Surgery,<sup>a</sup> Institute of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,<sup>b</sup> and Institute of Medical Informatics and Biometry,<sup>c</sup> University of Rostock, Rostock, Germany.

Dr. Liebold received financial support from Maquet Cardiopulmonary Inc. Maquet Cardiopulmonary Inc had no involvement in the study design or interpretation of results.

Received for publication Dec 22, 2005; accepted for publication March 13, 2006.

Address for reprints: Christian A. Skrabal, MD, Department of Cardiac Surgery, University of Rostock, Schillingallee 35, D-18057 Rostock, Germany (E-mail: cskrabal@fastmail.fm).

J Thorac Cardiovasc Surg 2006;132:291-6  
0022-5223/\$32.00

Copyright © 2006 by The American Association for Thoracic Surgery

doi:10.1016/j.jtcvs.2006.03.017

Since its first successful clinical use in the early 1950s, cardiopulmonary bypass (CPB) has undergone a variety of technical improvements. Nonetheless, there are recent trends in minimizing or completely avoiding the current CPB, mainly to reduce the blood-foreign surface contact. According to the Society of Thoracic Surgeons National Database, serious complications develop in 20% of low-risk patients after cardiac surgery.<sup>1</sup> More than 20 years ago, Kirklin and colleagues<sup>2</sup> reported an activation of the complement system after CPB. It is common knowledge that CBP triggers a global defense reaction of the whole body, usually denoted as systemic inflammatory response syndrome.<sup>3,4</sup> An option to attenuate the deleterious CPB-related effects might be the strict reduction of foreign



surfaces, avoidance of blood–air contact, and modification of the pump itself. The advantages of such a minimized system have been shown in clinical studies by our group and others.<sup>5,6</sup> The minimal extracorporeal circulation (MECC) circuit used is a closed, fully heparin-coated, and preconnected extracorporeal circulation system consisting of a diffusion membrane oxygenator and a centrifugal pump but foregoing a reservoir for pericardial suction blood.

The contact activation of blood cells with artificial surfaces and air, the operative trauma itself, ischemia/reperfusion injury, hemodilution, and endotoxemia caused by intestinal hypoperfusion are the predominant triggers of complement activation, alteration of the cytokine steady-state, alteration of coagulation and fibrinolysis, activation of immune-competent cells, and endothelial damage.<sup>7</sup> So far, assessment of endothelial function has been accomplished by analysis of specific plasma markers such as von Willebrand factor (vWf), soluble thrombomodulin (sTM), soluble E-selectin, tissue plasminogen activator, or soluble endothelial cell protein C receptor. More recently, a novel method for assessing vascular integrity was established: the determination of circulating endothelial cells (CECs) immunomagnetically separated from the peripheral blood. Under physiologic conditions, CECs occur in the blood of healthy individuals in the range of 5 cells/mL, whereas elevated numbers are found among those with sickle cell anemia, rickettsial, and cytomegalovirus infections, Behçet disease, various forms of vasculitis, and type 2 diabetes mellitus.<sup>8–10</sup> Mutin and colleagues<sup>11</sup> detected elevated CECs in patients with acute myocardial infarction and unstable angina. CECs have also been shown to correlate with disease status and response to treatment in patients with renal transplant rejection or acute myeloid leukemia.<sup>12,13</sup>

In this pilot study, we investigated the endothelial activation in patients with cardiovascular disease before, during, and after cardiac surgery. The endothelial disturbance was sought to delineate by enumeration of CECs and analysis of vWf and sTM. By randomly using the MECC system or standard CPB, we evaluated the endothelial damage induced by each system.

## Patients and Methods

The study was approved by the local ethical board. Twenty nondiabetic patients scheduled for elective coronary artery bypass graft surgery were prospectively randomized into 2 groups of 10 patients each according to the type of CPB used. Exclusion criteria were ejection fraction less than 25%, age more than 80 years, emergency operation, redo or combined cardiac surgery, severe renal dysfunction with or without requiring dialysis, and hepatic disorder. The randomization plan (20 patients in 2 sub-blocks) was generated by an open-access web-based tool (<http://www.tufts.edu/~dallal/PLAN.HTM>). For standard CPB, a polypropylene, microporous (0.2  $\mu$ m), hollow-fiber oxygenator (Jostra Quadrox, Maquet Cardiopulmonary AG,

Hirrlingen, Germany) with cardiotomy suction reservoir was used with a roller pump (Jostra HL 20, Maquet Cardiopulmonary AG). The MECC system introduces a new polymethylpenten hollow-fiber oxygenator with a plasmatic diffusion membrane (Jostra Quadrox D, Maquet Cardiopulmonary AG) and a centrifugal pump (Jostra RotaFlow, Maquet Cardiopulmonary AG), whereas fundamental components are reduced to minimal elements as arterial and venous lines or completely omitted as the cardiotomy reservoir. Both systems including the oxygenators were heparin coated and ensured a nonpulsatile flow of 2.0 to 2.5 L  $\cdot$  min  $\cdot$  m<sup>2</sup> body surface area. Ten healthy volunteers served as controls (7 males, 3 females) to evaluate the preoperative endothelial activation status of patients with cardiovascular disease.

## Anesthesia

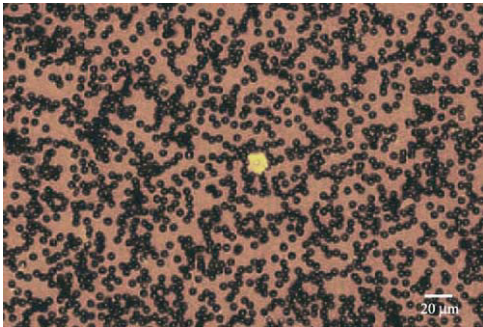
Anesthesia was induced with 1  $\mu$ g/kg sufentanil, 0.2 mg/kg etomidate, 0.04 mg/kg midazolam, and 0.15 mg/kg cisatracurium. Anesthesia was maintained with sufentanil, totaling 1  $\mu$ g/kg/h and midazolam 0.1 mg/kg/h; supplemental sevoflurane was given until CPB. No volatile drugs were added during CPB.

## Operation

Approximately 300 IU heparin per kilogram of total body weight was administered for systemic anticoagulation to aim at a target activated coagulation time of 350 to 400 seconds. The arterial cannula was placed in the ascending aorta, and the venous 2-stage cannula was placed in the right atrium. Lines were connected with diligence to avoid gaseous bubbles. Myocardial protection was achieved by antegrade administration of Calafiore blood cardioplegia. Mild hypothermia (31°C–32.5°C) was instituted immediately after CPB start, measured by an esophageal temperature probe. Low-dose aprotinin (1  $\times$  10<sup>6</sup> IU) was administered in the CPB priming solution. In addition, the anesthesiologist applied 1  $\times$  10<sup>6</sup> IU aprotinin per hour of CPB. The aorta was crossclamped while the distal anastomoses were completed. The proximal vein anastomoses were established with partial occlusion of the ascending aorta while the patient was rewarmed. Blood from the surgical site was collected in the cardiotomy reservoir in the standard CPB group or in a cell-saving device in the MECC group. Thereby, cell saving was processed at a certain blood volume (>0.5 L), and salvaged blood was retransfused only if necessary. After CPB, protamine (1 mg/100 units of total heparin) was administered to antagonize heparin.

## Samples and Endothelial Markers

Analysis was performed preoperatively, 30 minutes, 6 hours, 12 hours, 24 hours, and 48 hours after CPB initiation. Blood was collected into citrate tubes and centrifuged at 3345g for 15 minutes (Heraeus Multifuge 1 S-R, Osterode, Germany), and supernatant was frozen at –70°C for batch analysis. vWf antigen (Ag) was measured by immunoturbidimetric determination using the Dade Behring vWf:Ag test kit (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Germany). For determination of sTM concentration a commercial solid-phase sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kit was used (human sCD141 ELISA kit, Diaclone Research, Besançon, France).



**Figure 1.** Representative microphotography of a rhodamine-labeled CEC caught by several magnetobeads. Fluorescent microscopy, 20× magnification.

Circulating Endothelial Cell Analysis

Blood samples for CEC quantification were taken last in EDTA tubes to avoid contamination by endothelial cells from the vessel wall. CEC quantification was done immediately or if unavoidable no longer than 8 hours after collection and storage at 4°C. All laboratory work was performed in blinded fashion with respect to the identity of the samples.

To isolate CECs, we used M-450 Dynabeads, 4.5-μm diameter polystyrene beads coated with rat anti-mouse immunoglobulin-G1 (DynaI, Hamburg, Germany) coupled with murine anti-human CD146 antibody (Biocytex, Marseilles, France). One milliliter of blood was diluted with 1 mL of phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% bovine serum albumin (BSA). Twenty microliters of FcR blocking agent (Miltenyi, Bergisch-Gladbach, Germany) were added to prevent nonspecific leukocyte binding and incubated with 100 μL anti-CD146-coated Dynabeads (8×10<sup>6</sup> beads/10 μL anti-CD 146) for 60 minutes while gently agitating in a head-over-head mixer. Cells bound to anti-CD146-coupled beads were separated from blood in a magnet (DynaI MPC), washed 4 times with PBS-BSA, and incubated in 100 μL of rhodamine-labeled Ulex-Europaeus-Agglutinin-1 solution (1:10 dilution, Linaris Wertheim, Germany) for 1 hour on an orbital shaker in darkness. Cells were washed, resuspended in 100 μL PBS-BSA, and counted in a Nageotte chamber (Brand, Wertheim, Germany) with a fluorescent microscope (Leica DMLB, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) equipped with an excitation filter N2 (BP 546/12). In accordance with others, CECs were identified as well-delineated round or oval rhodamine-labeled cells with a size of 10 to 40 μm and with more than 4 beads attached.<sup>14</sup> Enumeration of CECs was done 2 times each sample, in case of deviation, and the average value was taken. Figure 1 shows a CEC caught by several magnetobeads.

Statistical Analysis

All data were stored and analyzed using the SPSS statistical package 12.0 (SPSS Inc. Chicago, Ill). Descriptive statistics were computed for variables of interest. The computed statistics included mean and standard deviations. Because of the small number of patients and controls and the low power resulting in a failure to falsify a null hypothesis, statistical tests regarding normal distri-

**TABLE 1. Patients' demographics**

Criteria	Standard CPB	MECC	P value
Number (n)	10	10	
Age (y)	65.2 ± 9.6	67.5 ± 10.3	.61
Male/female	8/2	7/3	.27
Preoperative EF	0.50 ± 0.07	0.46 ± 0.15	.55
Previous MI (<30 d)	4 (0)	5 (1)	.65
CPB time (min)	102.6 ± 24.0	90.2 ± 35.4	.27
Grafts	3.80 ± 0.79	3.50 ± 0.85	.42
ICU stay (d)	1.1 ± 0.31	1.1 ± 0.31	.99

MECC, Minimal extracorporeal circulation; CPB, cardiopulmonary bypass; EF, ejection fraction; MI, myocardial infarction; ICU, intensive care unit.

bution of variables were not carried out. Consequently, nonparametric tests were used. For the preoperative moment, values were available for all 3 groups; therefore, differences were analyzed with the Kruskal-Wallis test and, if necessary, in pairs between the groups with the Mann-Whitney U test including Bonferroni correction, which means an alpha level of 0.05/3 = 0.017. After CPB initiation, values were available only in the 2 experimental groups, and comparisons were made with the Mann-Whitney U test each time (alpha level = 0.05/5 = 0.01). Within-group comparisons between all moments were made with the Friedman test. If the hypothesis of equality of all 6 moments was rejected, comparisons between the preoperative moment and the other 5 postoperative times were made by using Wilcoxon tests with Bonferroni correction (alpha level = 0.05/5 = 0.01). Generally, all P values resulted from 2-sided tests and without Bonferroni correction a P value of less than .05 was considered to indicate statistical significance.

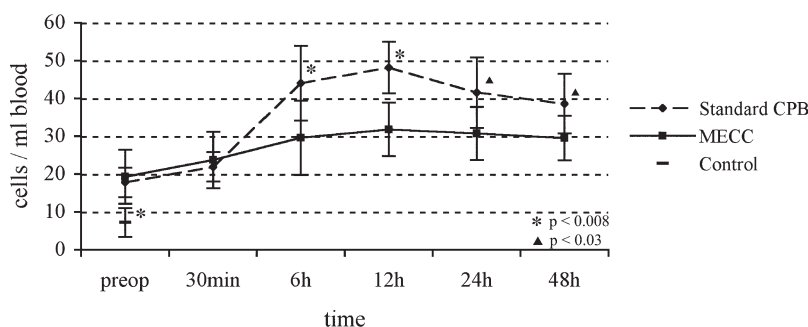
Results

Patients' perioperative demographics are shown in Table 1. There was no statistical difference between the experimental groups regarding age, gender ratio, preoperative ejection fraction, CPB duration, number of grafts, and intensive care unit stay. Four patients in the standard CPB group and 5 patients in the MECC group had a history of myocardial infarction. One patient in the MECC group had a recent myocardial infarction within the last 30 days (19 days). The postoperative course was uneventful in all patients. Only 1 patient in the standard CPB group required homologous blood transfusion on postoperative day 2. Retransfusion of cell-saver blood was not required in any of the patients in the MECC group.

Circulating Endothelial Cells

Preoperative CEC numbers (cells per milliliter of blood) did not differ between the experimental groups (standard CPB: 17.8 ± 3.9, MECC: 19.3 ± 7.1; P = .971) but were significantly higher than in the healthy controls (7.2 ± 3.8; P < .001 for both of the comparisons) (Figure 2). During CPB, CECs demonstrated only a slight elevation. At 6 hours, CECs increased significantly compared with baseline in both groups and peaked at 12 hours after CPB initiation,

CSP



**Figure 2.** Course of circulating endothelial cells (CECs) in patients with cardiovascular disease before, during, and after surgery. CECs increased significantly in both groups post-CPB versus pre-CPB, each time with lower numbers in the MECC group versus standard CPB group. CEC enumeration in healthy controls indicated a higher endothelial baseline activity in patients with cardiovascular disease. CPB, Cardiopulmonary bypass; MECC, minimal extracorporeal circulation.

each time with significantly lower values in the MECC group (6 hours:  $44.0 \pm 9.9$  vs  $29.6 \pm 9.8$ ,  $P = .007$ ; 12 hours:  $48.1 \pm 6.8$  vs  $31.8 \pm 7.1$ ,  $P < .001$ ). At 24 and 48 hours, CECs gradually decreased again with lower numbers in the MECC group (24 hours:  $41.5 \pm 9.3$  vs  $30.7 \pm 7.0$ ,  $P = .011$ ; 48 hours:  $38.6 \pm 7.9$  vs  $29.5 \pm 5.9$ ,  $P = .023$ ). Friedman tests documented significant changes in CECs in both experimental groups ( $P < .001$ ). At any time, postoperative values were significantly higher than initial values (Wilcoxon test:  $P = .005$  for each test).

### Von Willebrand Factor Antigen

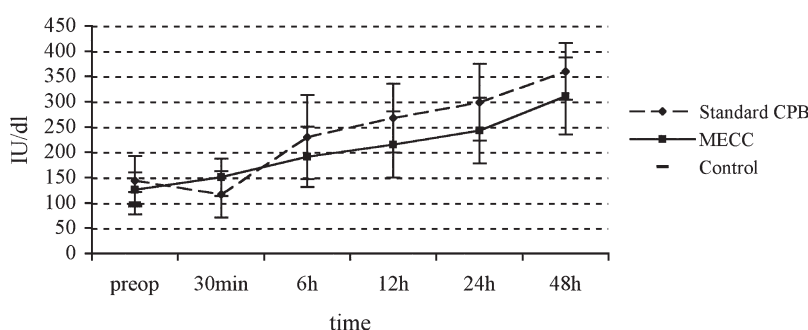
Preoperative vWf:Ag (international units/deciliter) did not differ between the experimental groups (standard CPB:  $143.7 \pm 48.9$ , MECC:  $126.4 \pm 33.7$ ; Mann-Whitney  $U$  test:  $P = .436$ ), but its concentration strongly tended to higher values in both groups of patients with cardiovascular disease compared with the healthy controls ( $99.5 \pm 22.1$ , standard CPB: Mann-Whitney  $U$  test:  $P = .019$ ; MECC: Mann-Whitney  $U$  test:  $P = .075$ ) (Figure 3). After surgery, vWf:Ag increased in both experimental groups (Friedman test:  $P < .001$ , Wilcoxon test:  $P = .005$  for each test). Even if the postoperative plasma concentrations of vWf:Ag tended to be lower in the MECC group (6 hours:  $191.1 \pm 59.4$  vs  $230.0 \pm 83.0$ ; 12 hours:  $215.3 \pm 65.5$  vs  $267.3 \pm 68.0$ ; 24 hours:  $242.9 \pm 64.9$  vs  $298.8 \pm 76.2$ ; 48 hours:  $311.1 \pm 76.4$  vs  $359.8 \pm 56.4$ ), differences between the groups were not statistically significant (Mann-Whitney  $U$  test:  $P > .085$  for each test).

### Soluble Thrombomodulin

Plasma concentration of sTM (nanograms/milliliter) was similar in preoperative cardiovascular patients and healthy controls (standard CPB  $2.3 \pm 1.3$ , MECC  $1.8 \pm 0.9$ , controls  $1.7 \pm 0.8$ ; Kruskal-Wallis test:  $P = .638$ ) (Figure 4). ©Friedman©tests©documented©significant changes within both experimental groups ( $P < .001$ ). Whereas in the standard CPB group the postoperative sTM concentrations were significantly higher than preoperative concentrations at any time (Wilcoxon test:  $P = .005$  for each test), only the 48-hour increase was statistically significant (Wilcoxon test:  $P = .005$ ) in the MECC group. Nonetheless, there was no difference between the groups at any postoperative time.

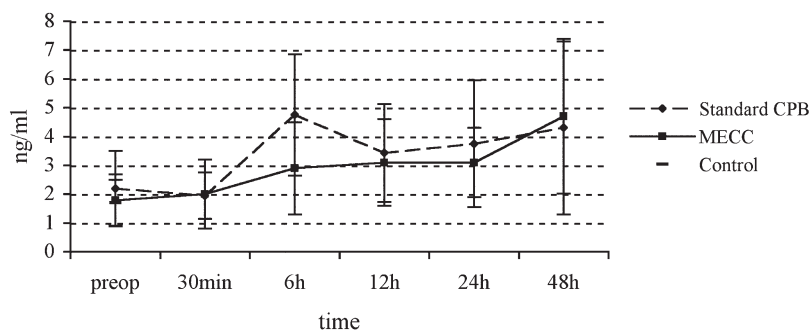
### Discussion

To our knowledge, this is the first study investigating the CPB-related endothelial activation by evaluation of CECs. The particular feature of CECs is that they not only unveil endothelial damage but also correlate with the activity and degree of endothelial injury.<sup>15,16</sup> CECs in our healthy volunteers were in the range of 7 cells/mL, which meets current results of other groups.<sup>10,17</sup> Mutin and colleagues<sup>11</sup> observed elevated CECs in patients 8 to 24 hours after acute myocardial infarction, whereas patients with stable angina did not show such phenomena. However, we detected high CEC numbers preoperatively in our elective patients with stable angina. Assuming Mutin and colleagues used the same separation



**Figure 3.** von Willebrand factor (vWf) plasma concentration increased significantly after CPB versus preoperative with a tendency toward lower values in the MECC group versus standard CPB group. vWf values of controls were lower than preoperative values of patients with cardiovascular disease. CPB, Cardiopulmonary bypass; MECC, minimal extracorporeal circulation.





**Figure 4. Soluble Thrombomodulin (sTm) increased significantly post-CPB versus pre-CPB. Baseline values of patients with cardiovascular disease did not differ from those of controls. CPB, Cardiopulmonary bypass; MECC, minimal extracorporeal circulation.**

technique and criteria for endothelial cell identification, we conclude that there has to be a difference in the severity of patients' cardiovascular atherosclerosis. Particularly, if these results are compared with the results in our healthy volunteers, we have to presume a higher endothelial baseline activity in patients with cardiovascular disease that might be supported by likewise elevated vWf. sTM was not elevated in our patients with cardiovascular disease, at least not preoperatively. This closely resembles the results of Chong and colleagues,<sup>18</sup> who observed a positive correlation between CECs and vWf but not between CECs and sTM.

The fact that CECs increase significantly after CPB might indicate an additional or new endothelial disturbance. Because CECs remained nearly unchanged in both setups during CPB, we do not assume a mechanical trigger like direct vascular manipulation during cannulation or surgery. The delayed increase more likely indicates a mediated mechanism of endothelial detachment caused by direct neutrophil attack, cytokines, and proteases.<sup>10</sup> In agreement with the theory that activated neutrophils interfere with endothelial cell contact, Scholz and colleagues<sup>19</sup> investigated the modulation of endothelial junction molecules by neutrophils isolated from patients undergoing cardiac surgery before and during CPB. They observed an impairment of the endothelial integrity by relocation of the zonula adherens molecule  $\beta$ -catenin caused only by neutrophils isolated at the end of CPB. Due to these results, CPB triggers a time-dependent activation of neutrophils that dissolve the endothelial connectivity and induce detachment of endothelial cells. The detached endothelial cells are floating in the bloodstream and can be detected by sufficiently sensitive methods. CD146 is expressed almost exclusively on mature endothelial cells, the exception being some tumor cell lines.<sup>20</sup> The immunomagnetic isolation technique we used is a modified method used by Woywodt and colleagues.<sup>14</sup> In addition, we determined endothelial plasma markers such as vWf and sTM, which are known to be related to endothelial damage and capable of predicting prognostic outcomes.<sup>18,21,22</sup> CECs, vWf, and sTM were

lowest preoperatively, remained low during CPB, and were elevated 6 hours after CPB initiation in both groups. While vWf and sTM further increased during observation time, CECs peaked at 12 hours and decreased further on.

One major aim of our study was the comparison of 2 different CPB setups. Although the endothelial markers responded similarly to CPB in both groups, the absolute values were lower or at least tended to be lower in the MECC group. In regard to the differences in the CPB setups, we assume that any use of different components might have an impact on inflammation-mediated endothelial function. The cardiotomy suction device increases the artificial surface area and introduces a blood-air interface, which both trigger a strong activation of cellular components.<sup>23,24</sup> Retransfusion of pericardial suction blood reinforces the inflammatory response.<sup>25,26</sup> Several studies revealed advantages of centrifugal over-roller pumps in regard to cellular activation, especially in the long term.<sup>27-29</sup> Finally, the oxygenators, even if structurally almost identical, differ with regard to the hollow-fiber material and tightness. The membrane in the Quadrox D (MECC system) has no pores, thus preventing air from entering the circuit. Furthermore, the special oxygenator coating aims at decreasing the inherent pressure gradient resulting in less hemolysis and decreased release of inflammatory mediators. However, in our study we compared the CPB systems as whole units well knowing that the influence of each component requires further analysis.

One of the limitations of this study is the relatively small number of patients in both experimental groups and the inequality between study groups and controls. Enrolling more patients would have increased the power of the study. Additional CEC isolation from different sampling sites, for example, the coronary sinus or pulmonary veins, would have delivered new insights into the origin of CECs and the potential correlation to organ ischemia. Stepwise modification of CPB would have allowed statements about the importance of the particular components for endothelial damage. All this must be subjected to further studies.

## Conclusion

CECs represent a novel marker enabling the assessment of endothelial injury. In contrast to well-established plasma markers, CECs seem to be more accurate in detecting the intrinsic endothelial damage. Patients with cardiovascular disease not only have a higher endothelial baseline activity than the healthy population but also sustain additional damage contingent on the CPB system used. Our results indicate that the MECC system may be less injurious to endothelium than the standard CPB. As this was a pilot study, further investigations are needed to validate our observations.

## References

- Grover FL. The Society of Thoracic Surgeons National Database: current status and future directions. *Ann Thorac Surg.* 1999;68:367-73; discussion 374-6.
- Kirklin JK, Westaby S, Blackstone EH, Kirklin JW, Chenoweth DE, Pacifico AD. Complement and the damaging effects of cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1983;86:845-57.
- Ascione R, Lloyd CT, Underwood MJ, Lotto AA, Pitsis AA, Angelini GD. Inflammatory response after coronary revascularization with or without cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2000;69:1198-204.
- Asimakopoulou G. Mechanisms of the systemic inflammatory response. *Perfusion.* 1999;14:269-77.
- Fromes Y, Gaillard D, Ponzio O, Chauffert M, Gerhardt MF, Deleuze P, et al. Reduction of the inflammatory response following coronary bypass grafting with total minimal extracorporeal circulation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;22:527-33.
- Wiesenack C, Liebold A, Philipp A, Ritzka M, Koppenberg J, Birnbaum DE, et al. Four years' experience with a miniaturized extracorporeal circulation system and its influence on clinical outcome. *Artif Organs.* 2004;28:1082-8.
- Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;21:232-44.
- McClung JA, Naseer N, Saleem M, Rossi GP, Weiss MB, Abraham NG, et al. Circulating endothelial cells are elevated in patients with type 2 diabetes mellitus independently of HbA(1)c. *Diabetologia.* 2005;48:345-50.
- Haubitz M, Woywodt A. Circulating endothelial cells and vasculitis. *Intern Med.* 2004;43:660-7.
- Dignat-George F, Sampol J. Circulating endothelial cells in vascular disorders: new insights into an old concept. *Eur J Haematol.* 2000;65:215-20.
- Mutin M, Canavy I, Blann A, Bory M, Sampol J, Dignat-George F. Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood.* 1999;93:2951-8.
- Wierzbowska A, Robak T, Krawczynska A, Wrzesien-Kus A, Pluta A, Cebula B, et al. Circulating endothelial cells in patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.* 2005;75:492-7.
- Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, et al. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation.* 2003;76:1-4.
- Woywodt A, Goldberg C, Scheer J, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. An improved assay for enumeration of circulating endothelial cells. *Ann Hematol.* 2004;83:491-4.
- Woywodt A, Streiber F, de Groot K, Regelsberger H, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells as markers for ANCA-associated small-vessel vasculitis. *Lancet.* 2003;361:206-10.
- Solovey A, Lin Y, Browne P, Choong S, Wayner E, Hebbel RP. Circulating activated endothelial cells in sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 1997;337:1584-90.
- Woywodt A, Bahlmann FH, De Groot K, Haller H, Haubitz M. Circulating endothelial cells: life, death, detachment and repair of the endothelial cell layer. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17:1728-30.
- Chong AY, Blann AD, Patel J, Freestone B, Hughes E, Lip GY. Endothelial dysfunction and damage in congestive heart failure: relation of flow-mediated dilation to circulating endothelial cells, plasma indexes of endothelial damage, and brain natriuretic peptide. *Circulation.* 2004;110:1794-8.
- Scholz M, Nowak P, Blaheta R, Schuller A, Menon S, Cinatl J, et al. Relocalization of endothelial cell beta-catenin after coculture with activated neutrophils from patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *J Invest Surg.* 2004;17:143-9.
- Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Frances V, et al. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens.* 1996;48:531-9.
- Salomaa V, Matei C, Aleksic N, Sansores-Garcia L, Folsom AR, Juneja H, et al. Soluble thrombomodulin as a predictor of incident coronary heart disease and symptomless carotid artery atherosclerosis in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study: a case-cohort study. *Lancet.* 1999;353:1729-34.
- Conway DS, Pearce LA, Chin BS, Hart RG, Lip GY. Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with non-valvular atrial fibrillation. *Circulation.* 2003;107:3141-5.
- Gong J, Larsson R, Ekdahl KN, Mollnes TE, Nilsson U, Nilsson B. Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: both the biomaterial and the blood-gas phase interfaces induce complement activation in an in vitro model. *J Clin Immunol.* 1996;16:222-9.
- Gourlay T, Samartzis I, Taylor KM. The effect of haemodilution on blood-biomaterial contact-mediated CD11b expression on neutrophils: ex vivo studies. *Perfusion.* 2003;18:87-93.
- Aldea GS, Soltow LO, Chandler WL, Triggs CM, Vocelka CR, Crockett GI, et al. Limitation of thrombin generation, platelet activation, and inflammation by elimination of cardiectomy suction in patients undergoing coronary artery bypass grafting treated with heparin-bonded circuits. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;123:742-55.
- Westerberg M, Bengtsson A, Jeppsson A. Coronary surgery without cardiectomy suction and autotransfusion reduces the postoperative systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg.* 2004;78:54-9.
- Andersen KS, Nygreen EL, Grong K, Leirvaag B, Holmsen H. Comparison of the centrifugal and roller pump in elective coronary artery bypass surgery—a prospective, randomized study with special emphasis upon platelet activation. *Scand Cardiovasc J.* 2003;37:356-62.
- Linneweber J, Chow TW, Kawamura M, Moake JL, Nose Y. In vitro comparison of blood pump induced platelet microaggregates between a centrifugal and roller pump during cardiopulmonary bypass. *Int J Artif Organs.* 2002;25:549-55.
- Parolari A, Alamanni F, Naliato M, Spirito R, Franze V, Pompilio G, et al. Adult cardiac surgery outcomes: role of the pump type. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2000;18:575-82.

## Plasma Neurohormone Levels Correlate with Left Ventricular Functional and Morphological Improvement in LVAD Patients<sup>1</sup>

Larry O. Thompson, M.D.,\* Christian A. Skrabal, M.D.,\* Matthias Loebe, M.D., Ph.D.,\*‡  
Javier A. Lafuente, M.D.,\*‡ Rick R. Roberts, B.S.N.,\* Ahmet Akgul, M.D.,\* Vonne Jones, B.S.,\*  
Brian A. Bruckner, M.D.,\* Vinay Thohan, M.D.,\*‡ George P. Noon, M.D.,\*<sup>2</sup> and Keith A. Youker, Ph.D.\*

\*Michael E. DeBakey Department of Surgery, Division of Transplant Surgery and Assist Devices; †Department of Medicine, Section of Cardiology and ‡The Methodist DeBakey Heart Center, Baylor College of Medicine, Houston, Texas

Submitted for publication December 29, 2003

**Objective.** Brain natriuretic peptide (BNP) and endothelin-1 (ET-1) have been shown to be markers of left ventricular (LV) function. To determine the feasibility of using serial assays of these neurohormones in the assessment of cardiac status in the left ventricular assist device (LVAD) setting, we examined the relationship between LV function, myocardial morphology, and plasma levels of these hormones in LVAD recipients.

**Methods.** Plasma BNP and ET-1 levels were serially assayed in 19 end-stage congestive heart failure (CHF) patients before and after LVAD implantation with various devices (i.e., MicroMed DeBakeyVAD/DVAD, Novacor/NVAD, TCI Heartmate/TCI, Thoratec/TVAD). Echocardiography performed correspondingly at the time points of the hormonal assays and immunohistochemical collagen staining of left ventricular tissue samples, derived from six non-failing hearts as well as from LVAD patients at the time of device insertion and removal, were then contrasted. Patients were grouped according to device used and etiology of heart disease (ischemic or dilated cardiomyopathy, ICM/DCM).

**Results.** LVAD therapy significantly improved LV ejection fraction (EF%:  $21 \pm 3.8\%$  to  $28.11 \pm 3.57\%$ ), cardiac output (CO:  $3.49 \pm 1.3$  to  $7.3 \pm 0.2$  l/m), and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD:  $6.68 \pm 0.92$  versus  $4.79 \pm 1.54$  cm,  $P < 0.0001$ ) in all patients. Absolute BNP and ET-1 plasma levels remained significantly lower in all patients after LVAD implantation (both  $P < 0.001$ ). The NVAD group exhibited the most BNP reduction and EF% increase ( $P < 0.0004$  and  $P < 0.038$ , respec-

tively). Average collagen levels were reduced in all patients ( $P < 0.0005$ ). Among the devices, the NVAD group demonstrated the most evident change ( $P < 0.0036$ ), while there was comparable reduction in the DCM and ICM groups (both  $P < 0.03$ ). In general, postoperative BNP and ET-1 trends exhibited a notable parallelism with both manifesting bi-phasic tendencies and an inverse proportionality to corresponding EF% measurements.

**Conclusions.** Device selection appears to influence the cardiac morphological and neurohormonal expressive tendencies exhibited by recipients. Plasma BNP and ET-1 levels correlate with both LV function and myocardial morphological improvement. Alterations in the levels of these hormones during LVAD support may be real-time indicators of prevailing myocardial autocrine/paracrine activity and as such may be of potential use in future algorithms of cardiac assessment and therapeutic decision-making with regard to transplant urgency and/or possible device explantation. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Key Words:** brain natriuretic peptide; endothelin-1; left ventricular assist devices.

### INTRODUCTION

The incidence of congestive heart disease has reached near-epidemic proportions, with some 400,000 new cases diagnosed in the U.S. yearly [1]. For those suffering from intractable failure, ventricular assist devices (VADs) can provide the circulatory support necessary for survival, either as bridges to transplantation or, as promising preliminary evidence indicates, as possible bridges to recovery [2–4]. Reports of reductions in myocyte size, regression of extracellular matrix fibrosis, decreased levels of cardiac inflammation

<sup>1</sup> This study was supported by a grant from The Methodist Hospital Foundation, The Methodist Hospital, Houston, Texas.

<sup>2</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Michael E. DeBakey Department of Surgery, Division of Transplant Surgery and Assist Devices, Baylor College of Medicine, 6560 Fannin, Suite 1860, Houston, TX 77030. E-mail: gnoon@bcm.tcm.edu.



Patient Demographics							
Age	Sex	Diag	$\beta$ -Blockers	ACE Inh.	Inotropes	Digitalis	Diuretics
55.21	M: 78.95%	ICM: 63.2%	57.90%	94.70%	52.60%	26.32%	78.95%
Age range: 39-74							

Patients	BNP (pg/ml)		ET-1 (pg/ml)		EF %	
	BL	Min	BL	Min	BL	Max <sub>SUP</sub>
19	754.05	221.07	13.66	3.47	21.37	28.11
	$p < 0.0001$		$p < 0.0010$		$p < 0.0185$	

LVEDD (cm)		LVPEDD (cm)		LVSEDD (cm)		CO (l/m)		DurSup (d): 54.79
BL	Min	BL	Min	BL	Min	BL	Max <sub>SUP</sub>	
6.68	4.79	0.94	1.04	0.88	1.02	3.62	4.93	%Transpl: 68.42
$p < 0.0004$		$p < 0.3787$		$p < 0.1037$		$p < 0.0201$		

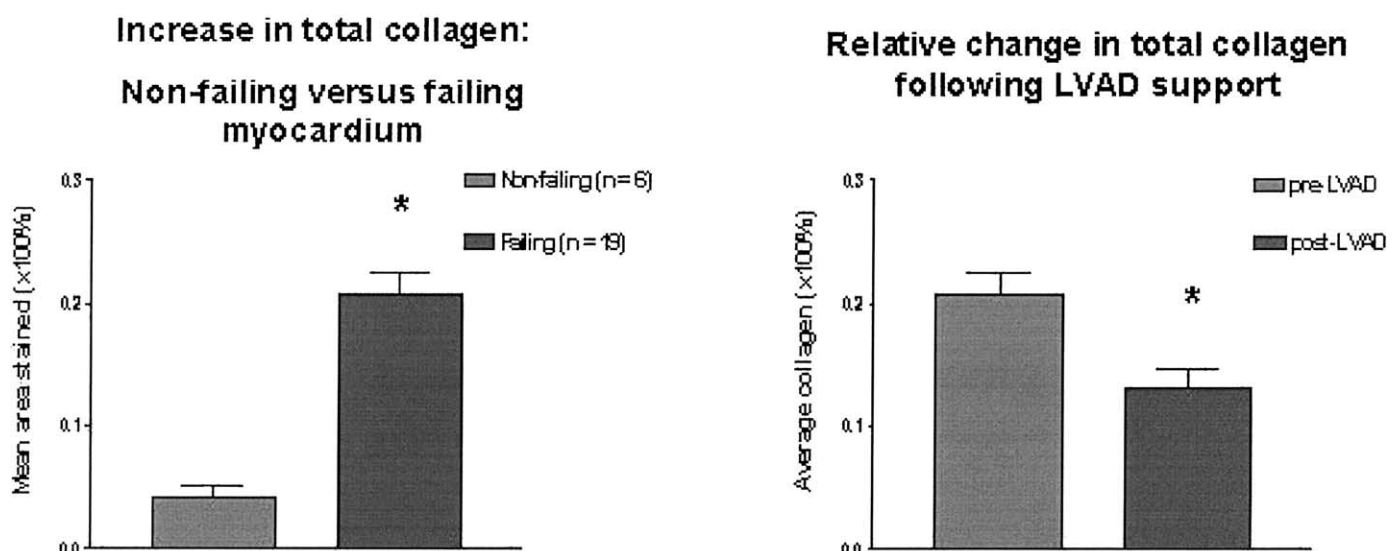
**FIG. 1.** LVAD patient ( $n = 19$ ) demographics, baseline (BL), and minimum (min) or maximum (maxsup) serial plasma neurohormone levels and echocardiographic indices during support (DurSup: duration of support).

markers, and increased ventricular contractile force after periods of extended mechanical support have been encouraging [5–9].

Patients with congestive heart failure (CHF) manifest increased levels of circulating neurohormones [10]. The natriuretic peptides, released by myocytes in response to excessive volumetric expansion and pressure overload, possess compensatory diuretic, natriuretic, and vasodilatory properties [11]. Of these, plasma b-type or brain natriuretic protein (BNP), synthesized in ventricular myocytes in large amounts in late fetal and early neonatal life only to decay to adult levels after birth, has been shown to be a specific and sensitive marker of heart failure [12, 13]. Indeed, re-expression of the gene encoding BNP in adult myocardium is considered to be one of the most reliable indicators of the activation of the hypertrophic pro-

gram in pathologic states and in experimental models of cardiac hypertrophy [14].

These neurohormones have become valuable indicators of the severity and, ultimately, the prognosis of heart disease [15, 16]. Several recent studies have explored the feasibility of using BNP in the risk-stratification of patients with dyspnea, pulmonary hypertension, silent myocardial ischemia, acute coronary syndromes such as unstable angina pectoris or myocardial infarction, and CHF [17–21]. Likewise, the role of endothelin-1 (ET-1), a polypeptide produced in both vascular smooth-muscle and endothelial cells with potent vasoconstrictive, mitogenic, and fibrogenic properties, in the progression of the maladaptive tendencies typifying the phenotype of CHF has attracted considerable interest [22–24]. Studies have made note of the inverse correlation existing between left ventricular ejection fraction and serum levels of ET-1.



**FIG. 2.** Total myocardial collagen content in normal subjects and in CHF patients before and after LVAD therapy (\* $P < 0.05$ ).

Serum levels of ET-1 correlate with the severity of symptoms in heart failure and are a strong predictor of mortality [25].

Preliminary investigations have shown that under mechanical unloading, plasma levels of neurohormones decrease [26, 27]. To date, however, efforts to quantify the influences of hemodynamic unloading upon cardiovascular function and neurohormone expression, and to what extent these influences may affect the prognostic value of these hormones in the monitoring of cardiac function during such support, have remained in a nascent state. The circulatory support obtained through the use of current support systems may variably affect the degree of cardiac phenotypical differentiation achievable during therapy. In particular, comparisons of the changes engendered by unloading with pulsatile *versus* the newer continuous axial flow devices have been rare.

The objective of this study was to examine more closely the neuroendocrinal and functional relationships that evolve as a consequence of ventricular assist device therapy. In so doing, we assessed the value of these hormone levels as adjuvant indicators of left ventricular function in the LVAD setting.

## METHODS

### Patient Population

The study, approved by the Baylor College of Medicine institutional review board, was designed as a non-randomized, parallel cohort study. A total of 19 prospective LVAD recipients, all end-stage CHF patients with confirmed New York Heart Association (NYHA) functional class III–IV status, were selected in an order-of-availability fashion. Informed consent was obtained from all patients or, in the event that patients could not themselves grant consent, from the closest relative. Suitability for inclusion in this study was determined by observation of criteria previously described [28].

Plasma BNP and ET-1 levels were serially measured directly before and at regular intervals after LVAD implantation. Patients were grouped with regard to etiology of heart disease (ischemic cardiomyop-

athy (ICM,  $n = 12$ ), and non-ischemic, dilated cardiomyopathy (DCM,  $n = 7$ ), as well as device type: axial flow (MicroMed DeBakey VAD) (DVAD, MicroMed Technologies, Houston, TX,  $n = 6$ ) and pulsatile (Novacor) (NVAD, Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL,  $n = 8$ ), TCI Heartmate (TCI,  $n = 3$ ) and Thoratec (TVAD,  $n = 3$ , both Thoratec Corp., Pleasanton, CA)). Although there exists to date no codified criteria for device/patient matching, device selection was contingent upon a number of factors including size, prevailing therapeutic exigency (for instance, the potential necessity of biventricular support stemming from post-cardiotomy failure), and projected duration of support. BNP and ET-1 levels, echocardiography, and immunohistochemical tissue analysis were then examined for correlations between these groups.

### Echocardiography

Cardiac imaging was rendered on a Sequoia ultrasound system (Acuson, Mountain View, CA) equipped with a 2.5-MHz probe. Two-dimensional and M-mode echocardiographic measurements (EF), left ventricular end-diastolic dimension (LVEDD), left ventricular posterior wall end-diastolic diameter (LVPEDD), and left ventricular septal wall end-diastolic diameter (LVSEDD) were determined with the patients on full support in accordance with American Society of Echocardiography recommendations [29]. Measurements were conducted using Digiview version 3.0 (Digisonics, Houston, TX). Cardiac output (CO) was determined by either end-diastolic area measurement by transesophageal echocardiography or the thermodilution method with Swan–Ganz.

### Neurohormone Panel Assays

On the day of the surgical procedure, a blood sample was drawn into tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 1 mg/ml blood) and placed on ice until centrifugation at 3500 rpm for 8 min at 4°C. The resulting supernatant (plasma) was then drawn off, divided into aliquots, and either immediately processed or snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assaying for BNP and ET-1.

**Serial plasma BNP.** The Triage B-Type Natriuretic Peptide test (Biosite Diagnostics, Inc., San Diego, CA) was used to measure plasma levels of BNP. The Triage BNP test is a fluorescence immunoassay designed for rapid quantitative determination of BNP in whole blood or plasma as per manufacturer's instructions. The test is intended as a point-of-care diagnostic tool. The measurable range of the test is between 5 and 1300 pg/ml.

**Serial plasma ET-1.** Plasma levels of ET-1 were determined with the Parameter Human Endothelin-1 Immunoassay (R&D Systems,

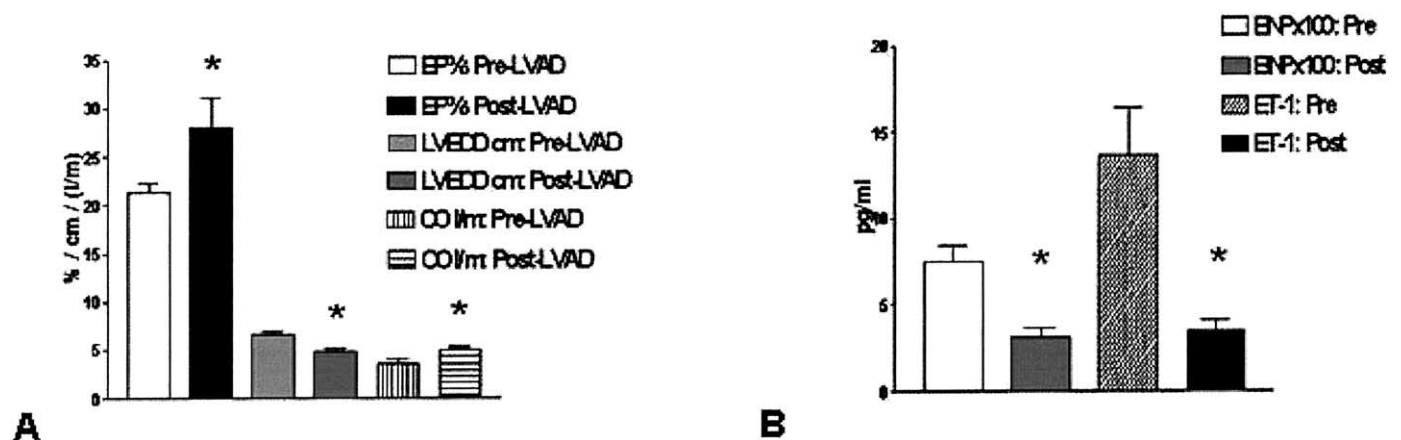
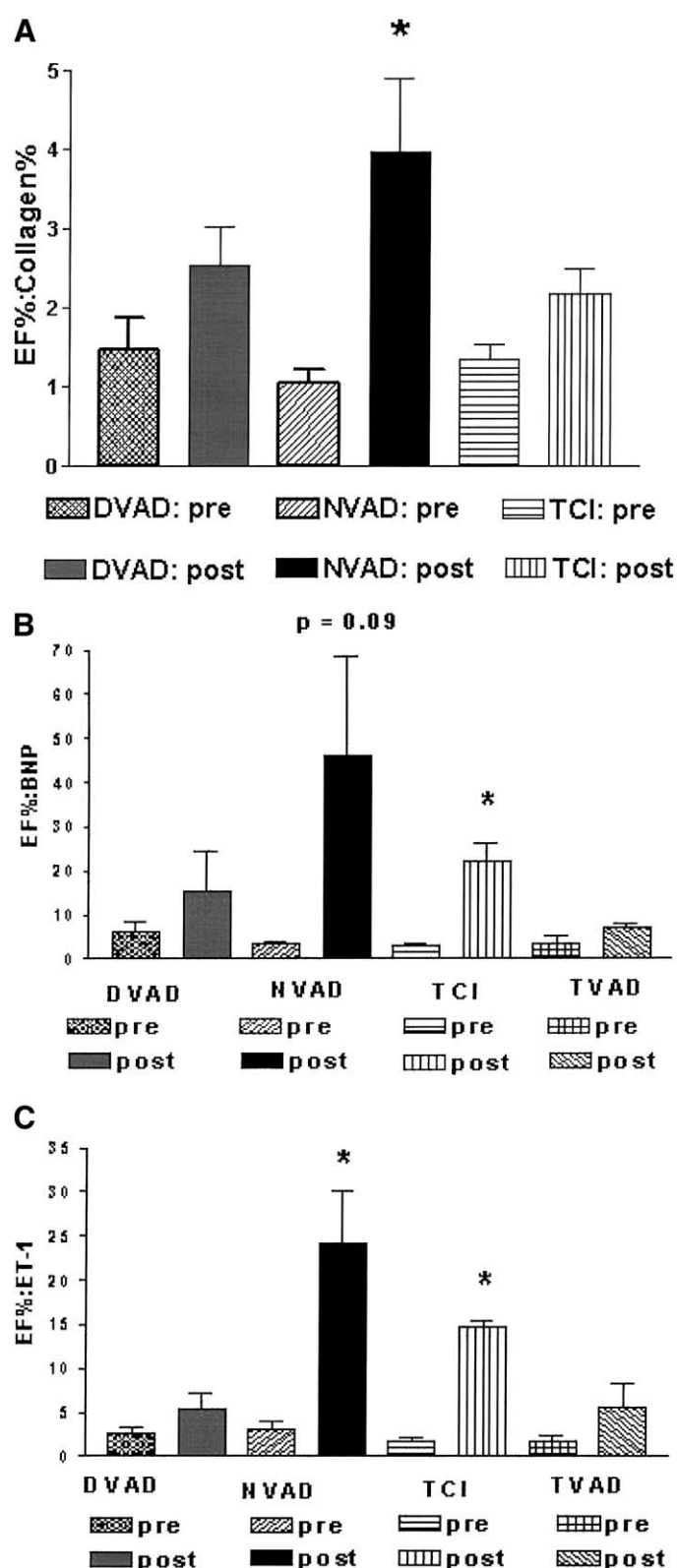


FIG. 3. (A) Change in mean echocardiographic indices and (B) mean plasma neurohormone levels during support.





**FIG. 4.** (A) Per device change in EF% with respect to change in collagen during support; per device change in EF% with respect to BNP (B); and ET-1 (C) during support. The pulsatile devices Novacor and TCI Heartmate revealed the largest EF%:neurohormone ratio increases.

Inc., Minneapolis, MN), which employs the quantitative enzyme immunoassay technique. Briefly, after a preparatory EDTA plasma extraction and reconstitution procedure, prepared ET-1 antibody conjugated to horseradish peroxidase was added to microplate wells containing standards, controls (lyophilized synthetic human ET-1 samples of known concentrations), and the previously extracted patient sample. After incubation and repeated washing of the wells, a stabilized substrate solution containing tetramethylbenzidine was added to the wells. After further incubation, an acid stop solution was applied. Finally, the absorbance of each well was determined with a microplate reader set to a wavelength of 450 nm and compared to a standard curve.

#### Source of Human Myocardium and Myocardial Collagen Determination

Myocardial tissue was obtained from the left ventricular apex of CHF patients at the time of LVAD placement and device removal prior to orthotopic heart transplantation. Left ventricular tissue samples acquired from six non-failing hearts not used for transplantation served as normal controls. Samples were immediately immersed in 2% paraformaldehyde for 45 min and dehydrated in increasing concentrations of alcohol, cleared through xylene, and subsequently imbedded in paraffin. Prepared 5- $\mu$ m-thick histological slides were stained using standard protocols. The sections were rehydrated in xylene, graded alcohols, and de-ionized H<sub>2</sub>O, followed by submergence of the sections in 2% picro-sirius red stain. After 20 min of staining, the samples were rinsed, dehydrated, and mounted for microscopic analysis incorporating digital photography and Image-Pro Plus 4.0 software (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Total collagen content was considered to be the average sum of all areas stained within 10 microscopic fields per sample including interstitial fibrosis.

Echocardiographic monitoring and blood sampling were concurrently performed at specified intervals after LVAD implantation. Declared study endpoints were transplantation, device explantation, or death. Patients released for outpatient LVAD use during the routine course of their treatment were required to return for follow-up throughout the study period. LVAD patients slated for transplantation underwent all procedures normally scheduled for the week prior to the operation, if possible.

#### Statistical Analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard error. Differences between groups were examined by one-way analysis of variance (ANOVA) and the Tukey-Kramer multiple comparison test, followed by Pearson's or the Mann-Whitney nonparametric two-tailed Student's *t* test (GraphPad Prism 3.0 statistics software, San Diego, CA). *P* values less than 0.05 were considered significant.

#### RESULTS

All patients presented with NYHA III-IV heart failure under maximal medical therapy including inotropes and beta-blockers, the administration of which in this small group of decompensated patients had no statistical bearing on the comparative expression of preoperative BNP values. Ages ranged from 39 to 74 years with a mean age of  $55.21 \pm 2.88$  years. Men comprised nearly 79% of the patient pool, and over 63% of the probates were in the ICM classification. The average length of LVAD support was  $54.79 \pm 8.65$  days for all devices. Survival to transplantation was 68.42% (Fig. 1). A comparative listing of

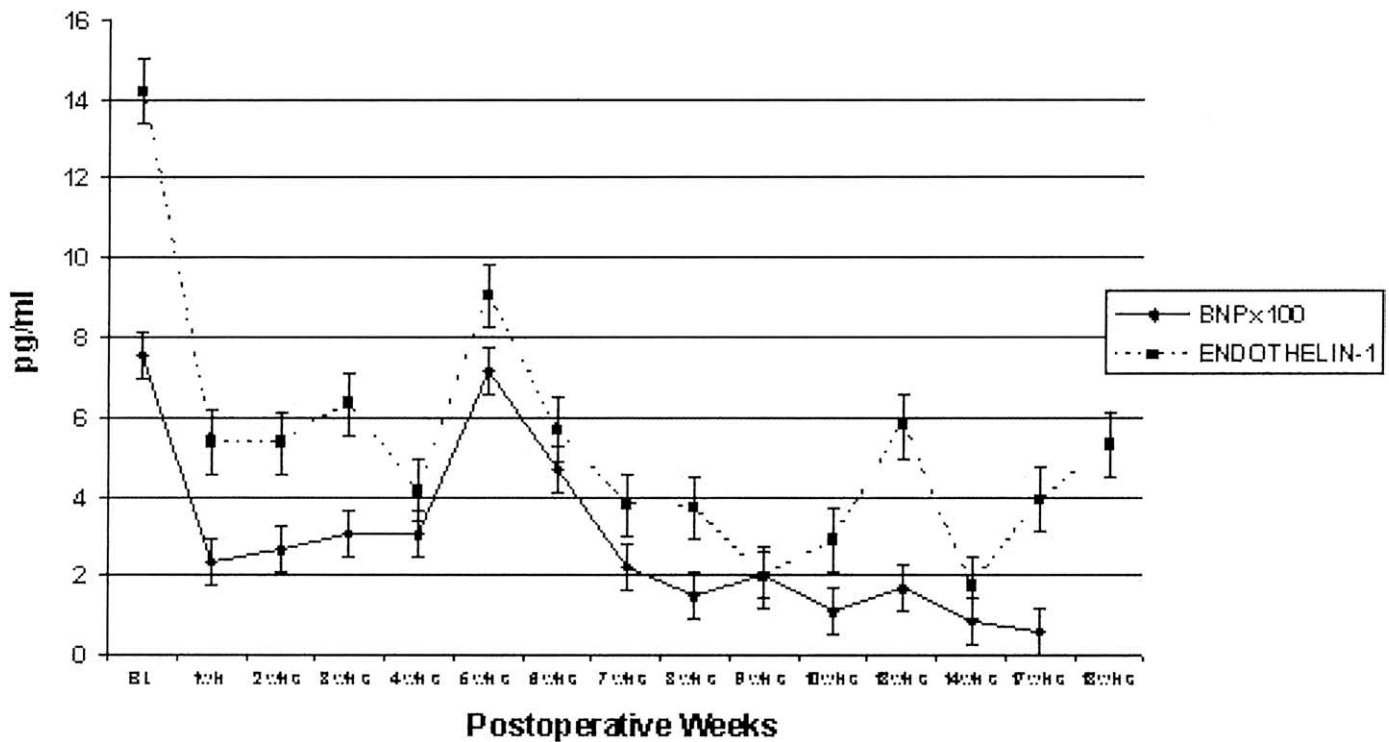


FIG. 5. Bi-phasic expressive tendencies of BNP and ET-1 during LVAD support suggests parallel regulatory mechanisms.

baseline (preoperative) BNP and ET-1 plasma levels as well as of selected echocardiographic indices *versus* the minimum values obtained during mechanical support revealed no differences preoperatively between groups regarding levels of either BNP ( $P < 0.301$ ) or ET-1 ( $P < 0.941$ ), nor LVEF% or LVEDD ( $P < 0.985$  and  $P < 0.152$ , respectively). At transplantation, all patients were classified NYHA II with corresponding BNP levels at around 220 pg/ml [30].

Average collagen levels were reduced in all patients as a group ( $P < 0.0005$ ) (Fig. 2). LVAD therapy significantly improved LV ejection fraction (EF%:  $21 \pm 3.8\%$  to  $28 \pm 3.57\%$ ,  $P = 0.038$ ), CO ( $3.62 \pm 1.3$  to  $4.93 \pm 0.2$  l/m,  $P = 0.039$ ), and LVEDD ( $6.68 \pm 0.92$  versus  $4.79 \pm 1.54$  cm,  $P < 0.0001$ ) in all patients. Other parameters were not appreciably altered (Fig. 3A). BNP and ET-1 reduction were seen in all patients postoperatively (BNP: from a mean of  $754.1 \pm 261.1$  to  $221.1 \pm 124.2$  pg/ml,  $P < 0.0001$ ; ET-1:  $13.66 \pm 11.98$  pg/ml versus  $3.47 \pm 2.96$  pg/ml,  $P < 0.0010$ ) (Fig. 3B). In inter-device comparisons of EF/collagen, EF/BNP, and EF/ET-1 ratios, the NVAD group exhibited the most positive EF-associated change with respect to collagen and hormonal levels (Fig. 4). This may, however, be related to duration of support. Although the mean support time for all patients was  $54.79 \pm 8.65$  days, there were considerable differences (e.g., 80.13 days for the NVAD group compared to 27.67 days for the DVAD patients). In general, the postoperative time courses of BNP and ET-1 mani-

fested comparable, when slightly time-delayed, bi-phasic tendencies that inversely corresponded to serial LVEF measurements in patients during this period (Figs. 5 and 6).

## DISCUSSION

Heightened neurohormonal activation adversely affects survival in patients with CHF [31]. Regional intracardiac production and activation of a number of these circulating agents (e.g., endothelin-1, angiotensin II, and norepinephrine) appear to mediate cardiac hypertrophy and functional integrity [30, 32–36]. In doing so, these peptides behave in an autocrine/paracrine manner. Indeed, burgeoning lines of evidence indicate a role for the natriuretic peptides beyond that of mere markers of cardiac hypertrophy [37]. As *in vitro* experiments with cultured cardiac fibroblasts have shown, their ability to perform as endogenous antagonists of myocyte growth through the inhibition of the protein synthesis and cytoskeletal reorganization that accompanies hypertrophy while suppressing collagen production and enhancing metalloproteinase activity suggests a function as modulators of the hypertrophic response as well [38–41]. Deletion studies incorporating knock-out mice for the BNP gene (*Nnpb*) as well as that of the ANP/BNP receptor, NPR-A (*Npr1*), have demonstrated significant increases in interstitial fibrosis and, thus, underscored

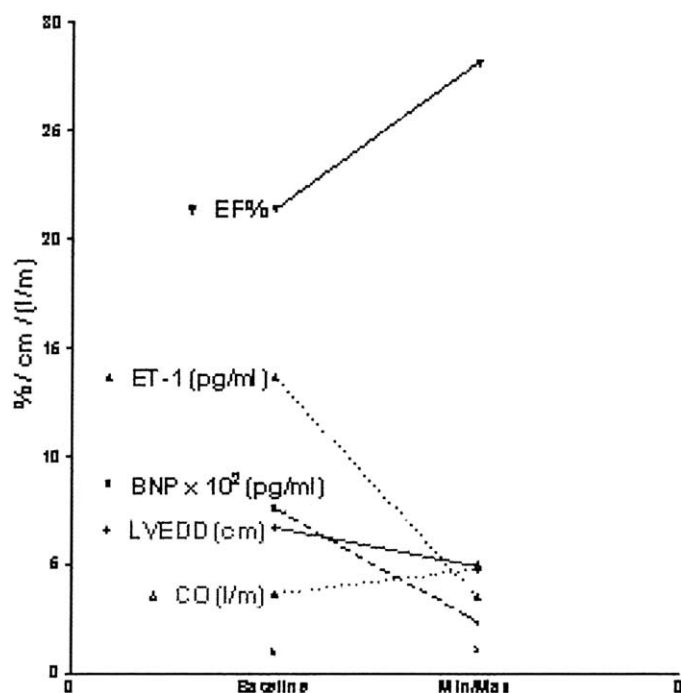


FIG. 6. Absolute changes in plasma neurohormonal levels and echocardiographic indices during mechanical support: EF% exhibits inverse proportionality to BNP, ET-1, and LVEDD.

the role of the natriuretic peptides as local regulators of ventricular remodeling [42, 43].

#### BNP, ET-1, and Myocardial Fibrosis

Plasma levels of BNP and ET-1 exhibited individual trends noted elsewhere [44, 45]. Our study, however, shows that ET-1 expression undergoes a regulatory tendency paralleling that of BNP during mechanical unloading. As transcription of natriuretic hormones is essential to volume homeostasis, the heightened pre-treatment expression of BNP reflects an endogenous compensatory response to the increased ventricular filling pressures, attendant myocardial elongation (stretch), and up-regulation of growth factor production (e.g., angiotensin II and ET-1) that is inherent to the pathology of CHF [46]. This response is further exacerbated by the progressive down-regulation of neurohormonal receptor responses in the myocardium of such patients [47]. Further, it has been postulated that the rise in circulating ET-1 in CHF is also attributable to enhanced vascular endothelial production induced by pulmonary congestion secondary to increased preload [48–50]. It is, therefore, reasonable to assume that the largely parallel reduction of BNP and ET-1 following unloading is a beneficial consequence of the regression of both myocardial stretch and pulmonary congestion under mechanical support [51]. With the return to a more physiological ventricular configuration and a reduction in growth factor production, a

concomitant improvement in ventricular architecture and function should be the result. Indeed, juxtaposition of device-specific EF%/collagen ratios to those of both EF%/BNP and EF%/ET-1 (Fig. 4) in our patients suggests this neurohormonal–morphological–functional relationship. Such load/fibrosis assumptions appear to be supported by proteomic studies linking angiotensin II (AT II) and ET-1 up-regulation of ET-1 gene expression in rat cardiac fibroblasts as autocrine/paracrine growth factors to natriuretic peptide inhibition of AT II stimulated proliferation of cardiac fibroblasts and, in turn, suggest a primarily load-induced, but growth factor-modulated, regulation of cardiac fibrosis [52–55].

Our results underscore the relationships of plasma BNP and ET-1 levels to echocardiographically derived LVEF measurements individually and, moreover, suggest a uniquely quantifiable relationship, on the one hand, between BNP and ET-1, and on the other hand, between these and myocardial morphological alteration as well as functional improvement in the mechanically supported patient.

#### Study Limitations

The small number of patients included in this preliminary study constitutes the major limitation. Inter-device flow differences were not accounted for in this study. Ultimately, echocardiographic studies performed on fully supported patients are limited with regard to meaningful assumptions of native cardiac function and may be restricted, as is here the case, to providing comparable vantage points for contrast purposes.

#### CONCLUSIONS

Device selection appears to influence the cardiac morphological and neurohormonal expressive tendencies exhibited by recipients. However, these tendentious differences may well be related to the duration of support on individual devices and it remains to be seen to what extent these changes may be translatable into device-specific disparities. Additional study is necessary to address this issue. Plasma BNP and ET-1 levels correlate with both LV function and myocardial morphological improvement. Alterations in the levels of these hormones during LVAD support may be real-time indicators of prevailing myocardial autocrine/paracrine activity and as such may be of potential use in future algorithms of cardiac assessment and therapeutic decision-making with regard to transplant urgency and/or eventual device removal.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant from The Methodist Hospital Foundation, The Methodist Hospital, Houston, TX. The Triage BNP Test was a gift from Biosite Diagnostics, Inc., San Diego, CA.



## REFERENCES

- O'Connell, J. B. The economic burden of heart failure. *Clin. Cardiol.* **23**: III6, 2000.
- Rose, E. A., Gelijns, A. C., Moskowitz, A. J., Heitjan, D. F., Stevenson, L. W., Dembitsky, W., Long, J. W., Ascheim, D. D., Tierney, A. R., Levitan, R. G., Watson, J. T., Meier, P., Ronan, N. S., Shapiro, P. A., Lazar, R. M., Miller, L. W., Gupta, L., Frazier, O. H., Desvigne-Nickens, P., Oz, M. C., and Poirier, V. L. Long-term mechanical left ventricular assistance for end-stage heart failure. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1435, 2001.
- Muller, J., Wallukat, G., Weng, Y. G., Dandel, M., Spiegelberger, S., Semrau, S., Brandes, K., Theodoridis, V., Loebe, M., Meyer, R., and Hetzer, R. Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* **96**: 542, 1997.
- Hetzer, R., Muller, J. H., Weng, Y., Meyer, R., and Dandel, M. Bridging-to-recovery. *Ann. Thorac. Surg.* **71**: S109, 2001.
- Bruckner, B. A., Stetson, S. J., Farmer, J. A., Radovancevic, B., Frazier, O. H., Noon, G. P., Entman, M. L., Torre-Amione, G., and Youker, K. A. The implications for cardiac recovery of left ventricular assist device support on myocardial collagen content. *Am. J. Surg.* **180**: 498, 2000.
- Hetzer, R., Muller, J., Weng, Y., Wallukat, G., Spiegelberger, S., and Loebe, M. Cardiac recovery in dilated cardiomyopathy by unloading with a left ventricular assist device. *Ann. Thorac. Surg.* **68**: 742, 1999.
- Zafeiridis, A., Jeevanandam, V., Houser, S. R., and Margulies, K. B. Regression of cellular hypertrophy after left ventricular assist device support. *Circulation* **98**: 656, 1998.
- Corry, D. C., DeLucia, A., III, Zhu, H., Radcliffe, R. R., Brevetti, G. R., El Khatib, H., Vance, S. J., Moyer, B. R., Cotts, W. G., and Richenbacher, W. E. Time course of cytokine release and complement activation after implantation of the HeartMate left ventricular assist device. *ASAIO J.* **44**: M347, 1998.
- Torre-Amione, G., Stetson, S. J., Youker, K. A., Durand, J. B., Radovancevic, B., Delgado, R. M., Frazier, O. H., Entman, M. L., and Noon, G. P. Decreased expression of tumor necrosis factor- $\alpha$  in failing human myocardium after mechanical circulatory support: A potential mechanism for cardiac recovery. *Circulation* **100**: 1189, 1999.
- Schrier, R. W., and Abraham, W. T. Hormones and hemodynamics in heart failure. *N. Engl. J. Med.* **341**: 577, 1999.
- Levin, E. R., Gardner, D. G., and Samson, W. K. Natriuretic peptides. *N. Engl. J. Med.* **339**: 321, 1998.
- Maisel, A. B-type natriuretic peptide levels: a potential novel "white count" for congestive heart failure. *J. Card. Fail.* **7**: 183, 2001.
- Dao, Q., Krishnaswamy, P., Kazanegra, R., Harrison, A., Amirnovin, R., Lenert, L., Clopton, P., Alberto, J., Hlavin, P., and Maisel, A. S. Utility of B-type natriuretic peptide in the diagnosis of congestive heart failure in an urgent-care setting. *J. Am. Coll. Cardiol.* **37**: 379, 2001.
- Wei, C. M., Heublein, D. M., Perrella, M. A., Lerman, A., Rodeheffer, R. J., McGregor, C. G., Edwards, W. D., Schaff, H. V., and Burnett, J. C., Jr. Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation* **88**: 1004, 1993.
- Bettencourt, P., Ferreira, A., Dias, P., Castro, A., Martins, L., and Cerqueira-Gomes, M. Evaluation of brain natriuretic peptide in the diagnosis of heart failure. *Cardiology* **93**: 19, 2000.
- Tsutamoto, T., Wada, A., Maeda, K., Hisanaga, T., Mabuchi, N., Hayashi, M., Ohnishi, M., Sawaki, M., Fujii, M., Horie, H., Sugimoto, Y., and Kinoshita, M. Plasma brain natriuretic peptide level as a biochemical marker of morbidity and mortality in patients with asymptomatic or minimally symptomatic left ventricular dysfunction. Comparison with plasma angiotensin II and endothelin-1. *Eur. Heart J.* **20**: 1799, 1999.
- de Lemos, J. A., Morrow, D. A., Bentley, J. H., Omland, T., Sabatine, M. S., McCabe, C. H., Hall, C., Cannon, C. P., and Braunwald, E. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* **345**: 1014, 2001.
- Morrison, L. K., Harrison, A., Krishnaswamy, P., Kazanegra, R., Clopton, P., and Maisel, A. Utility of a rapid B-natriuretic peptide assay in differentiating congestive heart failure from lung disease in patients presenting with dyspnea. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**: 202, 2002.
- Nakamura, T., Sakamoto, K., Yamano, T., Kikkawa, M., Zen, K., Hikosaka, T., Kubota, T., Azuma, A., and Nishimura, T. Increased plasma brain natriuretic peptide level as a guide for silent myocardial ischemia in patients with non-obstructive hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **39**: 1657, 2002.
- Omland, T., Aakvaag, A., Bonarjee, V. V., Caidahl, K., Lie, R. T., Nilsen, D. W., Sundsfjord, J. A., and Dickstein, K. Plasma brain natriuretic peptide as an indicator of left ventricular systolic function and long-term survival after acute myocardial infarction. Comparison with plasma atrial natriuretic peptide and N-terminal proatrial natriuretic peptide. *Circulation* **93**: 1963, 1996.
- Sabatine, M. S., Morrow, D. A., de Lemos, J. A., Gibson, C. M., Murphy, S. A., Rifai, N., McCabe, C., Antman, E. M., Cannon, C. P., and Braunwald, E. Multimarker approach to risk stratification in non-ST elevation acute coronary syndromes: simultaneous assessment of troponin I, C-reactive protein, and B-type natriuretic peptide. *Circulation* **105**: 1760, 2002.
- Levin, E. R. Endothelins. *N. Engl. J. Med.* **333**: 356, 1995.
- Sam, F., and Colucci, W. S. Role of endothelin-1 in myocardial failure. *Proc. Assoc. Am. Physicians* **111**: 417, 1999.
- Wei, C. M., Lerman, A., Rodeheffer, R. J., McGregor, C. G., Brandt, R. R., Wright, S., Heublein, D. M., Kao, P. C., Edwards, W. D., and Burnett, J. C., Jr. Endothelin in human congestive heart failure. *Circulation* **89**: 1580, 1994.
- Frey, B., Pacher, R., Locker, G., Bojic, A., Hartter, E., Woloszczuk, W., and Stanek, B. Prognostic value of hemodynamic vs big endothelin measurements during long-term IV therapy in advanced heart failure patients. *Chest* **117**: 1713, 2000.
- Delgado, R. M. III, and Willerson, J. T. Pathophysiology of heart failure: A look at the future. *Tex. Heart Inst. J.* **26**: 28, 1999.
- James, K. B., McCarthy, P. M., Thomas, J. D., Vargo, R., Hobbs, R. E., Sapp, S., and Bravo, E. Effect of the implantable left ventricular assist device on neuroendocrine activation in heart failure. *Circulation* **92**: II191, 1995.
- Deng, M. C., Loebe, M., E. L. Banayosy, A., Gronda, E., Jansen, P. G., Vigano, M., Wieselthaler, G. M., Reichart, B., Vitali, E., Pavie, A., Mesana, T., Loisanse, D. Y., Wheeldon, D. R., and Portner, P. M. Mechanical circulatory support for advanced heart failure: Effect of patient selection on outcome. *Circulation* **103**: 231, 2001.
- Devereux, R. B., Lutas, E. M., Casale, P. N., Kligfield, P., Eisenberg, R. R., Hammond, I. W., Miller, D. H., Reis, G., Alderman, M. H., and Laragh, J. H. Standardization of M-mode echocardiographic left ventricular anatomic measurements. *J. Am. Coll. Cardiol.* **4**: 1222, 1984.
- Tsutamoto, T., Wada, A., Maeda, K., Hisanaga, T., Maeda, Y., Fukai, D., Ohnishi, M., Sugimoto, Y., and Kinoshita, M. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: prognostic role of plasma

- brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation* **96**: 509, 1997.
31. Greenberg, B. Treatment of heart failure: state of the art and prospectives. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **38**(Suppl. 2): S59, 2001.
  32. Akiyama-Uchida, Y., Ashizawa, N., Ohtsuru, A., Seto, S., Tsukazaki, T., Kikuchi, H., Yamashita, S., and Yano, K. Nor-epinephrine enhances fibrosis mediated by TGF-beta in cardiac fibroblasts. *Hypertension* **40**: 148, 2002.
  33. Dostal, D. E. Regulation of cardiac collagen: Angiotensin and cross-talk with local growth factors. *Hypertension* **37**: 841, 2001.
  34. Kawano, H., Do, Y. S., Kawano, Y., Starnes, V., Barr, M., Law, R. E., and Hsueh, W. A. Angiotensin II has multiple profibrotic effects in human cardiac fibroblasts. *Circulation* **101**: 1130, 2000.
  35. McEwan, P. E., Gray, G. A., Sherry, L., Webb, D. J., and Kenyon, C. J. Differential effects of angiotensin II on cardiac cell proliferation and intramyocardial perivascular fibrosis in vivo. *Circulation* **98**: 2765, 1998.
  36. Tamura, T., Said, S., Harris, J., Lu, W., and Gerdes, A. M. Reverse remodeling of cardiac myocyte hypertrophy in hypertension and failure by targeting of the renin-angiotensin system. *Circulation* **102**: 253, 2000.
  37. Gardner, D. G. Natriuretic peptides: Markers or modulators of cardiac hypertrophy? *Trends Endocrinol. Metabol.* **14**: 411, 2003.
  38. Horio, T., Nishikimi, T., Yoshihara, F., Matsuo, H., Takishita, S., and Kangawa, K. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension* **35**: 19, 2000.
  39. Ogawa, Y., Tamura, N., Chusho, H., and Nakao, K. Brain natriuretic peptide appears to act locally as an antifibrotic factor in the heart. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**: 723, 2001.
  40. Tamamori, M., Ito, H., Hiroe, M., Marumo, F., and Hata, R. I. Stimulation of collagen synthesis in rat cardiac fibroblasts by exposure to hypoxic culture conditions and suppression of the effect by natriuretic peptides. *Cell Biol. Int.* **21**: 175, 1997.
  41. Tsuruda, T., Boerrigter, G., Huntley, B. K., Noser, J. A., Cataliotti, A., Costello-Boerrigter, L. C., Chen, H. H., and Burnett, J. C., Jr. Brain natriuretic Peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. *Circ. Res.* **91**: 1127, 2002.
  42. Ellmers, L. J., Knowles, J. W., Kim, H. S., Smithies, O., Maeda, N., and Cameron, V. A. Ventricular expression of natriuretic peptides in Npr1(-/-) mice with cardiac hypertrophy and fibrosis. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **283**: H707, 2002.
  43. Kishimoto, I., Rossi, K., and Garbers, D. L. A genetic model provides evidence that the receptor for atrial natriuretic peptide (guanylyl cyclase-A) inhibits cardiac ventricular myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 2703, 2001.
  44. Milting, H., E. L. Banayosy, A., Kassner, A., Fey, O., Sarnowski, P., Arusoglu, L., Thieleczek, R., Brinkmann, T., Kleesiek, K., and Korfer, R. The time course of natriuretic hormones as plasma markers of myocardial recovery in heart transplant candidates during ventricular assist device support reveals differences among device types. *J. Heart Lung Transplant.* **20**: 949, 2001.
  45. Sodian, R., Loebe, M., Schmitt, C., Potapov, E. V., Siniawski, H., Muller, J., Hausmann, H., Zurbrugg, H. R., Weng, Y., and Hetzer, R. Decreased plasma concentration of brain natriuretic peptide as a potential indicator of cardiac recovery in patients supported by mechanical circulatory assist systems. *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**: 1942, 2001.
  46. van Wamel, A. J., Ruwhof, C., van der Valk-Kokshoom, L. E., Schrier, P. I., and van der, L. A. The role of angiotensin II, endothelin-1 and transforming growth factor-beta as autocrine/paracrine mediators of stretch-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Mol. Cell Biochem.* **218**: 113, 2001.
  47. Nakagawa, O., Ogawa, Y., Itoh, H., Suga, S., Komatsu, Y., Kishimoto, I., Nishino, K., Yoshimasa, T., and Nakao, K. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload. *J. Clin. Invest.* **96**: 1280, 1995.
  48. Boscoe, M. J., Goodwin, A. T., Amrani, M., and Yacoub, M. H. Endothelins and the lung. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**: 41, 2000.
  49. Cody, R. J., Haas, G. J., Binkley, P. F., Capers, Q., and Kelley, R. Plasma endothelin correlates with the extent of pulmonary hypertension in patients with chronic congestive heart failure. *Circulation* **85**: 504, 1992.
  50. Tsutamoto, T., Wada, A., Maeda, Y., Adachi, T., and Kinoshita, M. Relation between endothelin-1 spillover in the lungs and pulmonary vascular resistance in patients with chronic heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **23**: 1427, 1994.
  51. Fujii, T., Otsuka, T., Tanaka, S., Kanazawa, H., Hirata, K., Kohno, M., Kurihara, N., and Yoshikawa, J. Plasma endothelin-1 level in chronic obstructive pulmonary disease: relationship with natriuretic peptide. *Respiration* **66**: 212, 1999.
  52. Fujisaki, H., Ito, H., Hirata, Y., Tanaka, M., Hata, M., Lin, M., Adachi, S., Akimoto, H., Marumo, F., and Hiroe, M. Natriuretic peptides inhibit angiotensin II-induced proliferation of rat cardiac fibroblasts by blocking endothelin-1 gene expression. *J. Clin. Invest.* **96**: 1059, 1995.
  53. Knowles, J. W., Esposito, G., Mao, L., Hagaman, J. R., Fox, J. E., Smithies, O., Rockman, H. A., and Maeda, N. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **107**: 975, 2001.
  54. Walther, T., Klostermann, K., Heringer-Walther, S., Schultheiss, H. P., Tschope, C., and Stepan, H. Fibrosis rather than blood pressure determines cardiac BNP expression in mice. *Regul. Pept.* **116**: 95, 2003.
  55. Malhotra, R., Sadoshima, J., Brosius, F. C. III, and Izumo, S. Mechanical stretch and angiotensin II differentially upregulate the renin-angiotensin system in cardiac myocytes In vitro. *Circ. Res.* **85**: 137, 1999.

## Role of Mast Cells and Their Mediators in Failing Myocardium Under Mechanical Ventricular Support

Ahmet Akgul, MD, Christian A. Skrabal, MD, Larry O. Thompson, MD, Matthias Loebe, MD, PhD, Javier A. Lafuente, MD, George P. Noon, MD, and Keith A. Youker, PhD

- Background:** Mast cells have been implicated in tissue remodeling and fibroblast stimulation. We explored the effect of mechanical support by left ventricular assist device (LVAD) in failing myocardium and looked into grade and distribution of interstitial fibrosis, mast cell density, mast cell phenotypes and basic fibroblast growth factor (bFGF) expression pre- and post-LVAD.
- Methods:** Myocardial tissue was obtained from 20 patients with end-stage cardiomyopathy at the time of LVAD implantation and LVAD removal and from 7 donor hearts not used for transplantation. Tissue sections were stained for mast cells using tryptase as a marker and the myocardial fibrosis was measured. Double staining for tryptase and chymase was performed for detection of chymase-positive mast cells. Fluorescent microscopy showed the relationship of mast cells to bFGF, and bFGF expression was quantified by Western blot.
- Results:** There was a significant increase in mast cells in heart failure vs normal myocardium. A secondary increase in mast cells occurred after long-term (>40 days) support compared with matched pre-LVAD samples (mean  $\pm$  SEM;  $57.4 \pm 8.6$  cells/10 fields vs  $45.1 \pm 7.6$  SEM cells/10 fields,  $p < 0.01$ ). The secondary increase in mast cells was associated specifically with an increase in chymase-negative mast cells ( $p < 0.01$ ). These findings are statistically significant with concurrent decreased expression of bFGF and decreased fibrosis in the same patient tissues ( $p < 0.01$ ).
- Conclusions:** We suggest that, under long-term support, there is a change in phenotypic expression in mast cells, which can alter fibroblast functions. The decreased myocardial bFGF levels might be the result of these phenotypically altered mast cells. *J Heart Lung Transplant* 2004;23:709–15.

Left ventricular assist devices (LVADs) are used as a bridge to transplantation for patients with severe decompensated heart failure. The potential for recovery of the failing myocardium during LVAD support has been recently discussed.<sup>1–3</sup> Mechanical support was shown to be associated with re-modeling of the ventricular myocardium, including reduced myocardial collagen content, wall thickness and myocyte diameter, as well as normalization of left ventricular geometry and improvement in diastolic functions.<sup>1,4</sup> Although it has been suggested that these beneficial changes are attributed to long-term unloading of the ventricular myocar-

dium, the cellular mechanisms induced in LVAD-induced collagen reduction remain unclear.

Mast cells, the recognized key cells of inflammatory responses in allergies, are reported to play an important role in tissue homeostasis, remodeling and repair.<sup>5</sup> Besides histamine, lipid mediators, cytokines and specific growth factors, >50 mast cell-derived serine endopeptidases have been identified.<sup>6</sup> The majority of these enzymes have trypsin- or chymotrypsin-like activities.

There is a heterogeneous expression of granule proteinases in different tissues with regard to tryptase and chymase content.<sup>7,8</sup> There are at least 2 sub-types of mast cells normally identified: mast cells with only tryptase (MC<sub>T</sub>) and mast cells with tryptase and chymase (MC<sub>TC</sub>). Mast cells can stimulate collagen expression by heart fibroblasts,<sup>9</sup> but they can also contribute to collagen degradation by activating metalloproteinases.<sup>10</sup> Regarding mast cell proteases, chymase is fibrogenic probably by releasing the matrix-bound transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) and activating angiotensin II, and tryptase induces activation of metalloproteinases.<sup>9,11,12</sup> Basic fibroblast growth factor (bFGF) is produced by a variety of cells of mesodermal and neuroectodermal origin and is directly fibrogenic.<sup>13</sup>

Interestingly, mast cell numbers are increased in

<sup>a</sup>From the Michael E. DeBakey Department of Surgery, Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Submitted December 17, 2002; revised June 6, 2003; accepted June 12, 2003.

Supported by the George P. Noon Research Fund, the Turkish Ministry of Health and the German Research Foundation (DFG).

Reprint requests: Keith A. Youker, PhD, Department of Surgery, Baylor College of Medicine, One Baylor Plaza, Houston, TX 77030. Telephone: 713-798-4188. Fax: 713-796-0015. E-mail: kyouker@bmc.tmc.edu

Copyright © 2004 by the International Society for Heart and Lung Transplantation. 1053-2498/04/\$-see front matter. doi:10.1016/j.healun.2003.06.006

**Table 1.** Demographic Data from 20 Patients

Patient	Age	Gender	Etiology	Support/days
1	60	M	ICM	1
2	56	M	ICM	2
3	63	M	DCM	2
4	59	M	ICM	3
5	52	M	DCM	7
6	63	M	DCM	11
7	53	M	DCM	12
8	52	M	ICM	14
9	58	M	DCM	23
10	42	M	ICM	34
11	56	M	ICM	46
12	43	M	DCM	49
13	45	M	DCM	49
14	44	M	DCM	78
15	49	M	DCM	87
16	45	M	ICM	118
17	60	M	DCM	131
18	63	M	ICM	132
19	48	M	DCM	142
20	63	M	DCM	146

DCM, dilated cardiomyopathy; ICM, ischemic cardiomyopathy; M, male.

dilated and ischemic cardiomyopathy.<sup>14</sup> However, the effects of mast cells and their mediators in the ventricular interstitium remain unclear.

In this study we investigate the effect of long-term ventricular unloading by left ventricular assist devices (LVADs) in the failing myocardium. We assessed the grade and distribution of interstitial fibrosis, mast cell density, mast cell phenotypes and bFGF expression pre- and post-LVAD support.

## MATERIALS AND METHODS

### Source of Human Myocardium

Myocardial tissue was obtained from samples of 20 patients with end-stage cardiomyopathy at the time of LVAD implantation and orthotopic heart transplantation. The study data were obtained under institutional review board approval with informed consent from the participants. Table 1 shows the characteristics of the patient population studied. Etiology of heart failure was ischemia in 8 patients and idiopathic dilated cardiomyopathy in 12. Age range was from 42 to 63 years (mean  $\pm$  SEM:  $53.7 \pm 1.6$  years), the length of support varied from 1 to 146 days ( $54.3 \pm 11.8$  days). All patients were treated with diuretics, low-dose  $\beta$ -blocker, angiotensin-converting enzyme inhibitors and positive inotrope medication before receiving either the Novacor LVAD (Baxter Healthcare Corp.) or HeartMate LVAD (Thoratec Corp.). In addition, biopsies of 7 hearts not used for transplantation served as the control group with normal myocardium.

Histologic analysis on each patient failed to demonstrate evidence of active inflammatory infiltrates. A

biventricular cross-section of the explanted heart was obtained during the transplant to elucidate any regional differences within the heart. Histologic examination of right and left ventricle, apex and septum was performed.

### Mast Cell Density

Mast cell density was determined by the use of immunostaining with an anti-tryptase antibody (Chemicon, Temecula, CA). The prepared slides were stained using standard immunohistochemistry protocols. The sections were rehydrated in xylene, graded alcohols and dH<sub>2</sub>O, followed by submerging the sections in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes, washing in 1 $\times$  phosphate-buffered saline (PBS), and incubation with blocking serum (1% horse serum with 0.5% non-fat dry milk in PBS). Slides were incubated with primary antibody at a dilution of 1:100 in blocking serum for 30 minutes, followed by twice washing the slides in 1 $\times$  PBS (5 minutes each) and incubating with a biotinylated secondary antibody (from the mouse ABC Elite Vectastain Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 minutes. The slides were washed twice in 1 $\times$  PBS (5 minutes each) and incubated in avidin-biotin complex conjugated with horseradish peroxidase (HRP) according to the manufacturer's directions. The slides were then washed twice in 1 $\times$  PBS (5 minutes) and stained using a diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector Laboratories).

To determine the ratio of chymase-positive mast cells, dual staining (tryptase and chymase) was performed. Slides were stained for anti-chymase antibody (Chemicon) with an ABC-Alkaline Phosphatase Kit (Vector Laboratories) using the Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit, followed by staining for anti-chymase antibody using DAB as substrate.

Collagen was stained by applying Picro-Sirius Red stain on serial sections. Another group of slides were stained with Alcian Blue/Safranin O-stain to determine the relationship between mast cells and interstitial fibrosis. Briefly, 25.0 ml of 2N NaOAc (VWR Scientific Products) was added to 31 ml of 2N HCl (J.T. Baker Chemical Co.) and diluted to 250 ml with dH<sub>2</sub>O at pH 1.42. This solution was added to 900 mg Alcian Blue (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), 45 mg Safranin O (Sigma) and 1.2 g Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> (J.T. Baker). After 20-minute staining, the samples were dehydrated and mounted for microscopic analysis.

Mast cell numbers obtained from the consecutive fields were added together, and the number of mast cells (tryptase-positive cells) expressed as mean  $\pm$  SEM per 10 fields. The analysis was performed by observers blinded to the sample source.

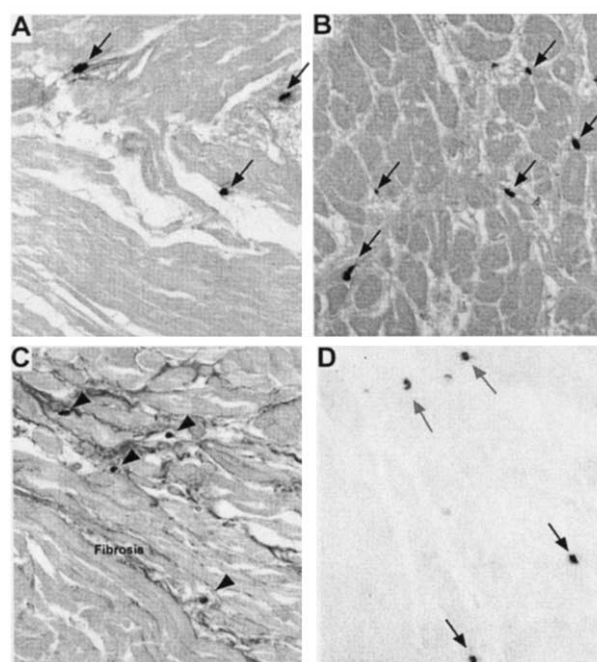
### Myocardial bFGF Levels

Basic FGF levels were measured by Western blotting. Tissue samples were homogenized for 30 seconds at 4°C with a PowerGen 700 homogenizer (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ), with 20 mmol/liter Tris-HCl (pH 7.4) containing 100 mmol/liter sodium chloride (NaCl), 2 mmol/liter phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 0.5 mg/liter leupeptin and 0.7 mg/liter pepstatin. Homogenates were then centrifuged at 13,000 rpm for 10 minutes and the supernatant was collected as the source of sample protein. Samples were run on a 20% polyacrylamide gel. For this purpose the samples were loaded at 50 µg/lane on the gel and run at a constant voltage of 80 V for about 6 hours, then the proteins were transferred from the gel to nitrocellulose paper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using standard techniques. The membrane was incubated in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 minutes. After washing with 1× PBS, the membrane was blocked for non-specific binding using blocking serum (1% horse serum with 0.5% non-fat dry milk in PBS). The membrane was incubated with primary antibody (goat anti-human fibroblast growth factor-2 [FGF-2] antibody, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) at a dilution of 1:100 in blocking serum for 30 minutes, washed in 1× PBS, and incubated with secondary antibody (from the goat ABC Elite Vectastain Kit) for 30 minutes. The membrane was then washed in 1× PBS and incubated in avidin-biotin complex conjugated with HRP and incubated with electrochemiluminescence (ECL) detection reagents (Amersham) according to the manufacturer's directions. Roentgenogram films were then obtained. Basic FGF content was determined by analysis of the resulting bands and analyzed by IMAGEProPLUS software for quantitation.

### Mast Cell and bFGF Staining in Fluorescent Microscopy

Mast cells were determined by immunostaining with an anti-tryptase antibody (NeoMarkers), and the content of the bFGF was determined using anti-FGF-2 (Santa Cruz Biotechnology). The sections were rehydrated in xylene, graded alcohols and dH<sub>2</sub>O. After washing the sections in 1× PBS, they were incubated with blocking serum (1% horse serum with 0.5% non-fat dry milk in PBS).

Slides were incubated with primary antibodies (mouse anti-human mast cell tryptase monoclonal antibody [NeoMarkers] and goat anti-human FGF-2 polyclonal antibody [Santa Cruz Biotechnology]) at dilutions of 1:1,000 and 1:100, respectively, in blocking serum for 30 minutes, followed by twice washing the slides in 1× PBS (5 minutes each) and incubation with secondary antibodies (anti-mouse IgG Cy3 conjugate fragment of sheep antibody [Sigma Co.], anti-goat IgG fluorescein isothiocyanate [FITC] conjugate developed in rabbit [Sigma]) for 30 minutes. The Slides then were washed



**Figure 1.** Staining for mast cells and collagen in the myocardium. (A) Immunostaining with anti-tryptase pre-LVAD (arrows). (B) Immunostaining with anti-tryptase post-LVAD. (C) Alcian Blue staining of mast cells in heart failure counterstained with Sirius Red for collagen identification. (D) Dual immunostaining with anti-tryptase (red arrows) and anti-chymase (black arrows).

twice in 1× PBS (5 minutes each), mounted with Vectashield DAPI mounting medium (Vector Laboratories), and photographed with a digital camera (Nikon) mounted fluorescent microscope.

### Statistical Analysis

Data are expressed as mean ± SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed to detect differences in mast cell density between different regions of the explanted heart. If the result of the ANOVA was significant ( $p < 0.05$ ), mast cell density and bFGF level comparisons between the patients before and after LVAD implantation were done using Student's *t*-test for each sample.  $p < 0.05$  was considered statistically significant.

### RESULTS

All patients underwent placement of an LVAD for medically refractory end-stage heart failure as a bridge to transplantation. The type of device had no influence on outcome. There was no statistical difference in mast cell density between 4 different regions of a single explanted heart (1-way ANOVA,  $p = 0.14$ ). Figure 1A,B shows stained slides obtained from the myocardium of a patient with end-stage heart failure at the time of LVAD implantation (Figure 1A) and at removal



(Figure 1B). Mast cells were localized primarily in areas of increased interstitial fibrosis adjacent to myocardial cells. This localization is clearly shown in Figure 1C for Alcian Blue-stained mast cells counterstained with Sirius Red, a collagen stain. Figure 1D shows that chymase-negative mast cells (red) and chymase-positive mast cells (black) were found in the myocardium. There was a significantly higher average number of mast cells in heart failure vs normal myocardium:  $32.1 \pm 2.3$  cells/10 fields vs  $13.8 \pm 1.9$  cells/10 fields ( $p = 0.04$ ).

In the myocardium of patients with short-term support (<40 days) there was no difference in mast cell numbers pre- and post-LVAD. The myocardial mast cell density after longer-term mechanical support (>40 days) was significantly higher than before LVAD implantation:  $57.4 \pm 8.6$  cells/10 fields vs  $45.1 \pm 7.6$  cells/10 fields ( $p < 0.01$ ) (Figure 2A). Dual staining for tryptase and chymase showed that this increase in mast cells after long-term mechanical support was associated specifically with an increase in chymase-negative mast cells, so there was a decrease in the ratio of chymase-positive mast cells to total mast cells ( $p = 0.01$ ) (Figure 2B).

Figure 3A-D demonstrates the relationship of mast cells to bFGF content in slides obtained using fluorescent microscopy. Figure 3A shows FITC staining for tryptase and Figure 3B shows Cy3 staining in the same field for bFGF. DAPI nuclear staining in this field is shown in Figure 3C, and Figure 3D depicts an overlay of all 3 stains. Tryptase-positive cells stained for bFGF were associated with interstitial fibrosis. Although Figure 3C shows many different kinds of cells, only mast cells contained significant bFGF (Figure 3D). Basic FGF levels were measured by immunoblotting and demonstrated a significant decrease of bFGF in the post-LVAD patient group ( $p < 0.01$ ) (Figure 4A,B).

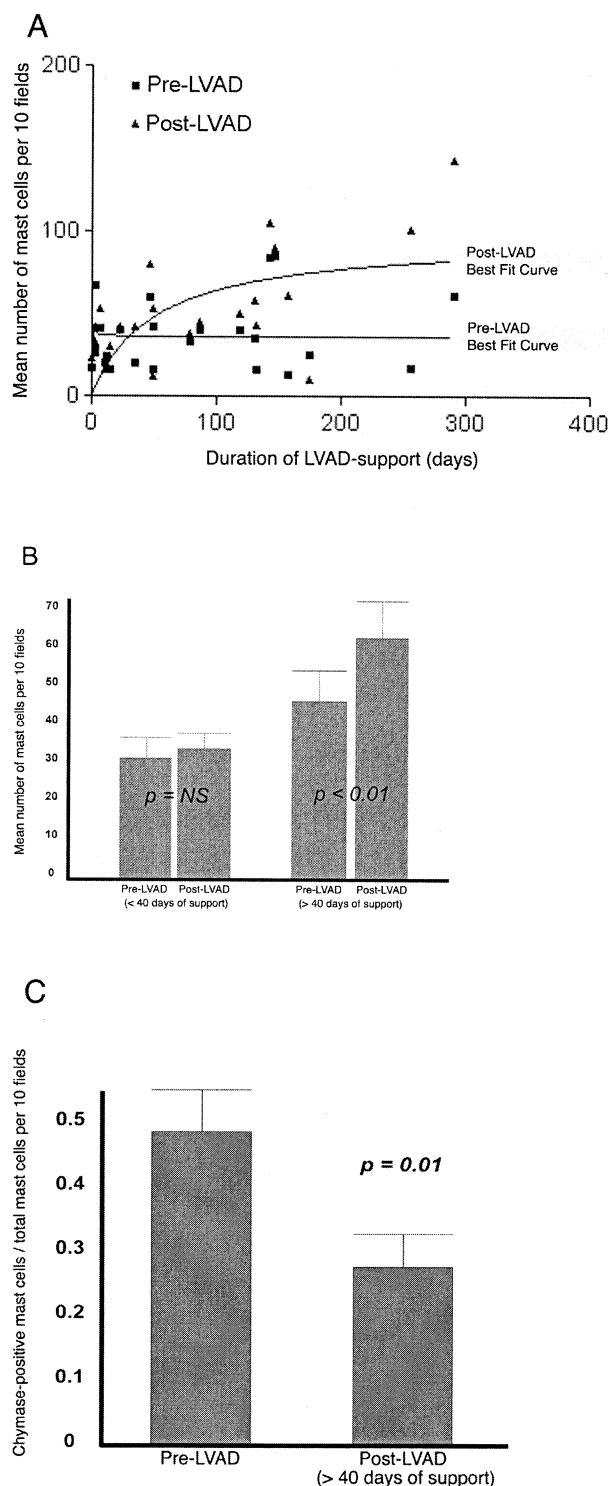
## DISCUSSION

Both dilated and ischemic cardiomyopathies are characterized by accumulation of interstitial collagen, especially collagen I, which leads to ventricular stiffness and diastolic dysfunction.<sup>16,17</sup> We previously reported a decrease in myocardial fibrosis after long-term mechanical support, contingent upon a reduction in collagen I and III.<sup>4,17</sup>

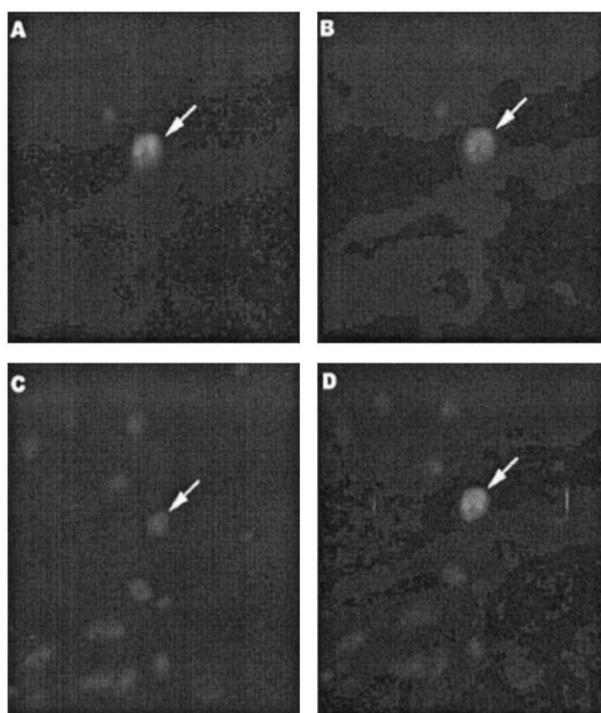
We have now demonstrated that myocardial mast cells increase in cardiomyopathy compared with normal myocardium and that a second increase occurs after long-term mechanical support. This second increase shows primarily chymase-negative mast cells and coincides with decreasing fibrosis. The concurrent decrease in bFGF supports the hypothesis that mast cells are also involved in the decrease in fibrosis, most likely by decreasing the release of fibrogenic mediators.

Tissue remodeling is a sophisticated interplay of many different factors. Mast cells have been shown to

play a role through the production of proteases, growth factors, cytokines and other mediators,<sup>5,18,19</sup> but the



**Figure 2.** Relation between mast cells, their phenotypes and duration of support. (A) Mast cell numbers in matched myocardial samples vs duration of support (days). (B) Myocardial mast cell density pre- and post-LVAD at <40 and >40 days of support. (C) Ratio of chymase-positive mast cells over total mast cells pre- and post-LVAD support of >40 days.

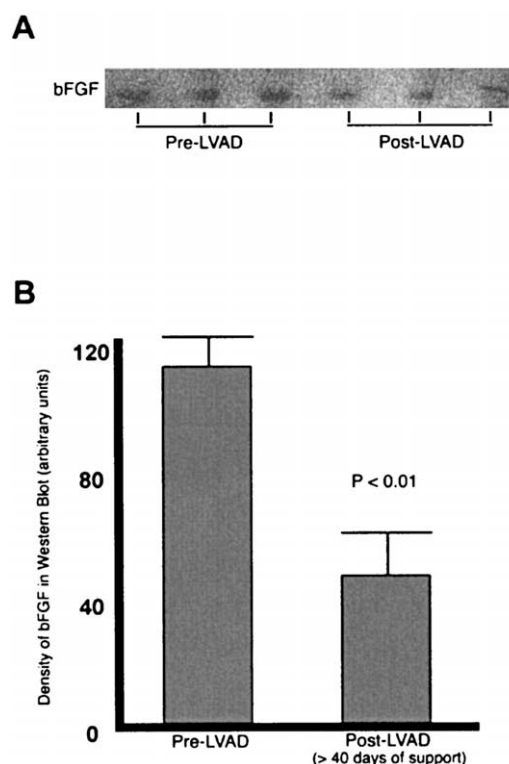


**Figure 3.** Diverse staining methods for fluorescent microscopy in the same field. (A) FITC staining for tryptase in post-LVAD myocardium using fluorescent microscopy (arrow). (B) Cy3 staining for bFGF in post-LVAD myocardium using fluorescent microscopy (arrow). (C) DAPI nuclear staining in post-LVAD myocardium using fluorescent microscopy. (D) Overlay of all stainings in (A)–(C).

exact pathway remains unclear. Several studies investigated the *in vitro* and *in vivo* influence of mast cell mediators on extracellular matrix synthesis and degradation. In this context, one must look at the activation of matrix metalloproteinases (MMPs) and collagen production simultaneously. There are, however, contradictory theories regarding the role of tryptase and chymase. On the one hand, tryptase may be involved in the development of interstitial fibrosis<sup>20</sup>; on the other hand, tryptase contributes to extracellular matrix degradation by degradation of fibronectin, fibrinogen and collagen VI, and activation of pro-MMP-3.<sup>10,21,22</sup>

Likewise, chymase is thought to be fibrogenic by conversion of angiotensin I to angiotensin II,<sup>23,24</sup> activation of pro-collagen I,<sup>12</sup> and release of TGF- $\beta$ .<sup>22,25</sup> However, chymase also activates MMP-1 and MMP-9<sup>26</sup> and inhibits TIMP-1.<sup>27</sup>

In our investigation the decrease of interstitial fibrosis was associated with a decreasing ratio of chymase-positive to chymase-negative mast cells. Also, there was a decrease in bFGF levels post-LVAD. Mast cells are considered the primary source of bFGF.<sup>19,28</sup> However, bFGF expression is also found in fibroblasts, myocytes, macrophages and extracellular matrix.<sup>19,29</sup> Seiler et al



**Figure 4.** bFGF content in pre- and post-LVAD myocardium. (A) Western blot for myocardial bFGF pre- and post-LVAD support of >40 days. (B) bFGF levels pre- and post-LVAD support of >40 days.

reported that, in dystrophin-deficient cats, bFGF levels correlate with muscle regeneration, but these levels decrease in later muscle regeneration stages.<sup>29</sup> Therefore, one might reason that the the presence of decreased bFGF levels post-LVAD is evidence of a regenerating myocardium.

In a current, ongoing study we are investigating if there are different bFGF levels in chymase-positive and chymase-negative mast cells. Initial observations have shown quantitatively different staining patterns for bFGF in various mast cells post-LVAD. Further research will provide more information about storage of chymase, tryptase and other mediators, especially if they are stored in different granules or in the same ones.<sup>8,21,30,31</sup> Findings showing improvement in ventricular function and myocardial recovery under mechanical ventricular support have already been published.<sup>3,4,32–35</sup> Although there are numerous data showing improvement in ventricular function, analyses regarding the development of interstitial myocardial fibrosis have shown differing conclusions.<sup>3,4,35</sup>

In this study we have demonstrated simultaneous changes in mast cell phenotype, extent of fibrosis and content of bFGF in myocardium unloaded for >40 days. We suggest that, under long-term LVAD support, this change in phenotypic expression in mast cells may alter

fibroblast functions and cause a shift of the tissue steady state toward decreased extracellular matrix.

The authors thank Imaobong M. Ekandem for her technical assistance.

## REFERENCES

1. Levin HR, Oz MC, Chen JM, Packer M, Rose EA, Burkhoff D. Reversal of chronic ventricular dilation in patients with end-stage cardiomyopathy by prolonged mechanical unloading. *Circulation* 1995;91:2717-20.
2. Mann DL, Willerson JT. Left ventricular assist devices and the failing heart: a bridge to recovery, a permanent assist device, or a bridge too far? *Circulation* 1998;98:2367-9.
3. Muller J, Wallukat G, Weng YG, et al. Weaning from mechanical cardiac support in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circulation* 1997;96:542-9.
4. Bruckner BA, Stetson SJ, Perez-Verdia A, et al. Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J Heart Lung Transplant* 2001;20:457-64.
5. Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM. Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing—active participants or innocent bystanders? *Exp Dermatol* 1999;8:1-16.
6. Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Res* 2000;28:45-8.
7. Irani AA, Schechter NM, Craig SS, DeBlois G, Schwartz LB. Two types of human mast cells that have distinct neutral protease compositions. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 1986;83:4464-8.
8. Irani AM, Schwartz LB. Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc* 1994;15:303-8.
9. de Almeida A, Mustin D, Forman MF, Brower GL, Janicki JS, Carver W. Effects of mast cells on the behavior of isolated heart fibroblasts: modulation of collagen remodeling and gene expression. *J Cell Physiol* 2002;191:51-9.
10. Gruber BL, Kew RR, Jelaska A, et al. Human mast cells activate fibroblasts: tryptase is a fibrogenic factor stimulating collagen messenger ribonucleic acid synthesis and fibroblast chemotaxis. *J Immunol* 1997;158:2310-7.
11. Brower GL, Chancey AL, Thanigaraj S, Matsubara BB, Janicki JS. Cause and effect relationship between myocardial mast cell number and matrix metalloproteinase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H518-25.
12. Kofford MW, Schwartz LB, Schechter NM, Yager DR, Diegelmann RF, Graham MF. Cleavage of type I procollagen by human mast cell chymase initiates collagen fibril formation and generates a unique carboxyl-terminal propeptide. *J Biol Chem* 1997;272:7127-31.
13. Walgenbach KJ, Gorospe JR, Gratas C, Brunagel G, Hoffman EP, Shestak KC. A Potential Role for Mast Cells in the of bFGF From Normal Myocytes During Angiogenesis In Vivo. *J Invest Surg* 2002;15:153-62.
14. Patella V, Marino I, Arbustini E, et al. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation* 1998;97:971-8.
15. Swan HJ. Left ventricular dysfunction in ischemic heart disease: fundamental importance of the fibrous matrix. *Cardiovasc Drugs Ther* 1994;8(Suppl 2):305-12.
16. Weber KT, Brilla CG. Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system. *Circulation* 1991;83:1849-65.
17. Bruckner BA, Stetson SJ, Farmer JA, et al. The implications for cardiac recovery of left ventricular support on myocardial collagen content. *Am J Surg* 2000;180:498-501.
18. Galli SJ. New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993;328:257-65.
19. Artuc M, Steckelings UM, Henz BM. Mast cell-fibroblast interactions: human mast cells as source and inducers of fibroblast and epithelial growth factors. *J Invest Dermatol* 2002;118:391-5.
20. Kondo S, Kagami S, Kido H, Strutz F, Muller GA, Kuroda Y. Role of mast cell tryptase in renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1668-76.
21. Caughey GH. Serine proteinases of mast cell and leukocyte granules. A league of their own. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:S138-42.
22. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J Leukoc Biol* 1997;61:233-45.
23. Caughey GH, Raymond WW, Wolters PJ. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta- chymases. *Biochim Biophys Acta* 2000;1480:245-57.
24. Chandrasekharan UM, Sanker S, Glynnias MJ, Karnik SS, Husain A. Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. *Science* 1996;271:502-5.
25. Bernasconi P, Di Blasi C, Mora M, et al. Transforming growth factor-beta 1 and fibrosis in congenital muscular dystrophies. *Neuromuscul Disord* 1999;9:28-33.
26. Saarinen J, Kalkkinen N, Welgus HG, Kovanen PT. Activation of human interstitial procollagenase through direct cleavage of the Leu83-Thr84 bond by mast cell chymase. *J Biol Chem* 1994;269:18134-40.
27. Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, Fang KC. Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase. *J Immunol* 2001;166:2783-92.
28. Qu Z, Liebler JM, Powers MR, et al. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 1995;147:564-73.
29. Sciler G, Welle M, Busato A, Lin S, Gaschen F. Mast cell proliferation and alterations in bFGF amount and localization are involved in the response of muscle to dystrophin deficiency in hypertrophic feline dystrophy. *Neuromuscul Disord* 2001;11:56-71.
30. Craig SS, Schechter NM, Schwartz LB. Ultrastructural analysis of maturing human T and TC mast cells in situ. *Lab Invest* 1989;60:147-57.
31. Goldstein SM, Leong J, Schwartz LB, Cooke D. Protease composition of exocytosed human skin mast cell protease-proteoglycan complexes. Tryptase resides in a complex distinct from chymase and carboxypeptidase. *J Immunol* 1992;148:2475-82.
32. Hetzer R, Muller JH, Weng Y, Meyer R, Dandel M. Bridging-to-recovery. *Ann Thorac Surg* 2001;71:S109-13.

33. Hetzer R, Muller JH, Weng YG, Loebe M, Wallukat G. Midterm follow-up of patients who underwent removal of a left ventricular assist device after cardiac recovery from end-stage dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2000;120:843-53.
34. Loebe M, Hennig E, Muller J, Spiegelsberger S, Weng Y, Hetzer R. Long-term mechanical circulatory support as a bridge to transplantation, for recovery from cardiomyopathy, and for permanent replacement. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997;11(Suppl):S18-24.
35. Scheinin SA, Capek P, Radovancevic B, Duncan JM, McAllister HA, Jr., Frazier OH. The effect of prolonged left ventricular support on myocardial histopathology in patients with end-stage cardiomyopathy. *ASAIO J* 1992;38:M271-4.

## Interaction Between Isolated Human Myocardial Mast Cells and Cultured Fibroblasts<sup>1</sup>

Christian A. Skrabal, M.D.,<sup>2</sup> Larry O. Thompson, M.D., Robert E. Southard, M.D., David L. Joyce, M.D., George P. Noon, M.D., Matthias Loebe, M.D., Ph.D., and Keith A. Youker, Ph.D.

Baylor College of Medicine, Michael E. DeBakey Department of Surgery, Division of Transplant Surgery and Assist Devices, Houston, Texas

Submitted for publication December 4, 2003

**Introduction.** Previously, we reported an increase in interstitial collagen and total mast-cell numbers in heart failure *versus* normal myocardium. A secondary increase, primarily in chymase-negative mast cells, occurred following LVAD support compared to matched pre-LVAD tissue samples and was associated with a decrease in interstitial collagen and bFGF. To further elucidate the changes in interstitial collagen, we investigated the direct interaction between mast cells, isolated from failing myocardium with or without previous LVAD support, and human fibroblasts in a coculture model. Additionally, the expression of HSP-47, the pro-collagen-specific chaperone protein, was determined in the particular myocardium.

**Materials and methods.** Myocardial tissue was obtained from 10 patients with end-stage dilated cardiomyopathy (DCM) at the time of transplantation. Five patients were transplanted following LVAD support, five patients without previous LVAD support. Mast cells were isolated according to a standard protocol, including collagenase digestion and cell separation. The isolated mast cells were co-cultured with human fibroblasts for 12 h, with or without stimulation of degranulation, and protein synthesis was measured by [<sup>3</sup>H]-proline incorporation. HSP-47 immunostaining was performed in the different myocardial samples and the positive cells were quantified.

**Results.** Stimulated mast cells isolated from DCM tissue (without previous LVAD support) caused a 92% increase in [<sup>3</sup>H]-proline incorporation and conse-

quently in protein production in fibroblasts compared to mast-cell free culture ( $P < 0.01$ ), while conversely stimulated mast cells isolated from LVAD supported myocardium decreased the [<sup>3</sup>H]-proline incorporation by 63% ( $P < 0.01$ ) below baseline. Nonstimulated mast cells did not significantly alter the protein production over baseline. There was also a significant increase in the number of HSP-47-positive cells in DCM myocardium compared to normal ( $P < 0.01$ ) and there was a shift toward normal after LVAD support ( $P < 0.01$ ).

**Conclusion.** We demonstrate that fibroblast protein production *in vitro* is significantly altered by mast cells and that the direction of change is dependent on whether myocardium was supported by LVAD. We suggest that under long-term LVAD support there is a phenotypic alteration in myocardial mast cells, which leads to a change in concentration and/or composition of mediators, capable of re-modeling the myocardial matrix. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Key Words:** mast cells; cardiomyopathy; fibrosis; LVAD support; mast cell-fibroblast coculture model.

### INTRODUCTION

Cardiac fibroblasts constitute the majority of the non-myocyte cell population in the ventricular myocardium. These cells are located in the interstitium, in areas between and surrounding cardiac myocytes. Cardiac fibroblasts are responsible for the synthesis of extracellular matrix proteins such as fibrillar collagen Types 1 and 3, basement membrane Type 4 collagen, fibronectin, and laminin. In addition to its role in muscle development and myoblast differentiation, the extracellular matrix (ECM) consisting primarily of fibrillar collagen is an intricate and highly organized structure that serves to support cardiac myocytes and to maintain functional integrity of the myocardium.

<sup>1</sup> Presented at the 37th Annual Meeting of the Association for Academic Surgery, November 13–15, 2003, Sacramento, CA.

<sup>2</sup> To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Baylor College of Medicine, Michael E. DeBakey Department of Surgery, Division of Transplant Surgery and Assist Devices, 6560 Fannin Street, Suite 1860, Houston, Texas 77030. Fax: 713-797-0613. E-mail: cskrabal@fastmail.fm.

Balanced synthesis and degradation of this matrix is the key to normal development of cardiac muscle and physiological myocardial function. Collagen remodeling and accumulation has been demonstrated in several experimental models of cardiac hypertrophy. Recently, we reported a decrease in collagen content of the failing myocardium under mechanical ventricular unloading [1]. We also determined a close relationship between collagen steady state, mast cells, and their mediators. In the development of heart failure, an accumulation of interstitial collagen is associated with an increased number of mast cells. It is documented that mast cells in the human heart differ biochemically and immunologically from those in other anatomical sites, suggesting that the local microenvironment influences their phenotypic and biochemical characteristics [2]. In our previous investigation, the decrease in collagen under LVAD support was contingent primarily on an increase in chymase-negative mast cells and a decrease in bFGF. We hypothesize that there is a phenotypic alteration in myocardial mast cells following LVAD support, which leads to a change in concentration and/or composition of mediators capable of remodeling the myocardial matrix. To sustain our assumption, we investigate the direct interaction between mast cells, isolated from failing myocardium with or without previous LVAD support, and human fibroblasts in a coculture model. To further validate collagen production *in vivo*, we quantify heat-shock-protein-47 (HSP-47) expression in myocardial fibroblasts. HSP-47, a specific molecular chaperone, is involved in processing and secretion of pro-collagen [3].

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of Cardiac Mast Cells

Myocardial tissue was obtained from 10 patients with end-stage dilated cardiomyopathy (DCM) at the time of transplantation. Five patients were transplanted following LVAD support and five patients were transplanted without previous LVAD support. The explanted hearts were immediately rinsed in cold saline (4°C). The left ventricle and septum were removed and rinsed in cold Hank's balanced salt solution (HBSS). Tissue was then dissected in a Petri dish into 1- to 2-mm fragments. Tissue fragments were washed three times in HBSS and then incubated in enzymatic dispersion buffer containing HBSS, 160 U/ml type 2 collagenase, 100 U/ml hyaluronidase, 1 U/ml protease, and 304 U/ml deoxyribonuclease I three times at 37°C for 30, 15, and 15 min, respectively. At the end of the first incubation, the supernatant from the partially dispersed tissue was filtered through a 70- $\mu$ m-pore nylon mesh cell strainer into a 50-ml tube, diluted with HBSS, and centrifuged (40°C, 8 min, 160 G). The cell pellet from the first incubation was then re-suspended in 25 ml HBSS and cells were washed two more times with HBSS and pellets were re-suspended in HBSS and stored on ice. The supernatant from the second and third incubations in enzyme dispersion buffer were processed in a similar fashion and combined with cells from the first incubation. The combined cell isolations were collected by centrifugation and the pellet was re-suspended in DMEM. A portion of the cell isolate was stained histochemically to determine the number of mast cells obtained (approximately  $3.7 \times 10^4$ /ml).

### Collagen Production

Protein production of confluent fibroblast monolayer was assessed by [ $^3$ H]-proline incorporation into newly synthesized proteins including collagen. Equal numbers of isolated mast cells were added to confluent fibroblast cell cultures with the addition of [ $^3$ H]-proline. Total protein synthesis was determined in the co-cultures by scintillation counting of an aliquot of washed cells/matrix. A second aliquot was digested with collagenase followed by washing, precipitation, and scintillation counting to obtain non-collagenous [ $^3$ H]-proline incorporation. The mast-cell-specific degranulator, compound 48/80, was added as indicated.

The following conditions were used to determine collagen production at 12 h following cell incubations:

Fibroblasts + [ $^3$ H]-proline  
 Fibroblasts + [ $^3$ H]-proline + isolated mast cells  
 Fibroblasts + [ $^3$ H]-proline + isolated mast cells + Compound 48/80

Fibroblasts were seeded in 24-well tissue-culture plates ( $10^4$ /well) in 2 ml of supplemented DMEM/10% FCS until confluent. At the time of mast-cell isolation, confluent cell media were changed to DMEM/2% FCS to provide suboptimal growth and stimulation containing [ $^3$ H]-proline. Mast-cell isolates or media alone were added to individual wells with or without stimulation by compound 48/80. The co-cultures were incubated for 12 h and processed for [ $^3$ H]-proline incorporation.

Data are expressed as cpm of [ $^3$ H]-proline incorporation per well, and fibroblasts incubated with mast-cell isolates were compared with cultures incubated with medium alone.

### Myocardial HSP-47 Staining

HSP-47 staining was performed on matched tissue slides from 10 patients with DCM at the time of LVAD implantation and of transplantation following LVAD support. Tissue slides from five donor hearts not used for transplantation served as a control group. Myocardial HSP-47 levels were determined by the use of immunostaining with an anti-HSP-47 antibody (StressGen Biotechnologies Corp., Victoria, Canada). The prepared slides were stained using standard immunohistochemistry protocols. The sections were rehydrated in xylene, graded alcohols, and dH<sub>2</sub>O, followed by submerging the sections in 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, washing in 1 $\times$  PBS, followed by incubation with blocking serum (1% horse serum with 0.5% nonfat dry milk in 1 $\times$  PBS). Slides were incubated with primary antibody at a dilution of 1:100 in blocking serum for 60 min, followed by washing the slides twice in 1 $\times$  PBS (5 min each) and incubating with a biotinylated secondary antibody (from the mouse ABC elite vectastain kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 30 min. The slides were washed twice in 1 $\times$  PBS (5 min each) and incubated in avidin biotin complex conjugated with horseradish peroxidase (HRP) according to manufacturer's directions. Then the slides were washed twice in 1 $\times$  PBS (5 min) and stained using a diaminobenzidine (DAB) substrate kit (Vector Laboratories).

### Statistics

Statistical analysis was performed using the statistics software GraphPad Prism 3.0 for windows (San Diego, CA, USA). Differences among the groups were determined by the unpaired Students *t*-test and *P* < 0.05 was considered as significant.

## RESULTS

### Mast-Cell/Fibroblast Coculture System

Stimulated mast cells isolated from DCM tissue (without previous LVAD support) caused a 92% in-



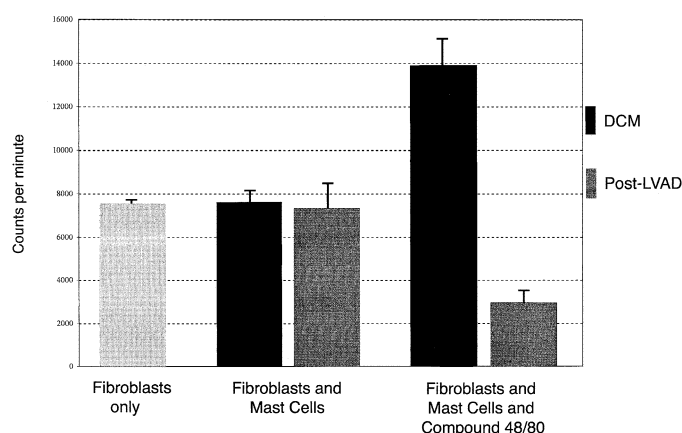


FIG. 1.  $^3\text{H}$ -proline incorporation in the coculture system.

crease in  $^3\text{H}$ -proline incorporation in fibroblasts compared to mast-cell free culture ( $P < 0.01$ ), while stimulated mast cells isolated from LVAD-supported myocardium decreased the  $^3\text{H}$ -proline incorporation by 63% ( $P < 0.01$ ) from media alone (Fig. 1). Non-stimulated mast cells did not significantly alter the protein production over baseline. Additional experiments showed that the fibroblast protein production was qualitatively similar in collagen and non-collagen proteins and that compound 48/80 alone had no effect on  $^3\text{H}$ -proline incorporation in cultured fibroblasts (data not shown).

#### HSP-47 Verification in Fibroblasts

While slides of normal myocardium exhibited little HSP-47 staining (one positive cell per microscopy field), there was a highly significant increase in HSP-47-positive cells in the pre-LVAD DCM tissue (34 positive cells per microscopy field;  $P < 0.01$ ). Post-LVAD myocardium revealed a tremendous decrease in HSP-47-positive cells (eight positive cells per microscopy field;  $P < 0.01$ ). Fig. 2A–D shows representative HSP-47 staining in pre-LVAD, post-LVAD, and normal myocardium. All HSP-47-positive cells also stained positive for the fibroblast marker vimentin. Fig. 3 addresses the decrease in HSP-47-positive cells following LVAD support.

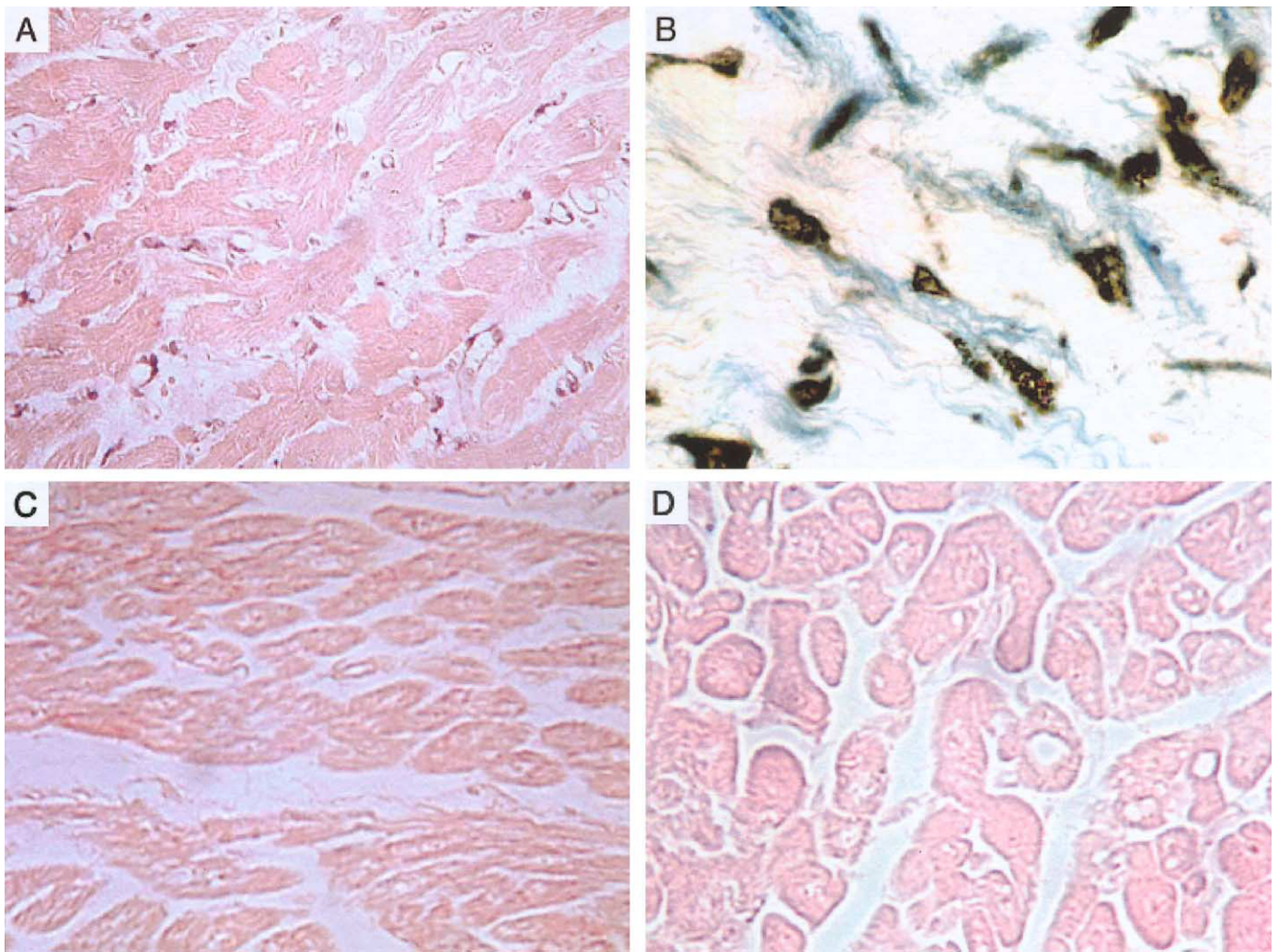
#### DISCUSSION

In this study, we have examined the effect of mast cells, isolated from normal, failing, and post-LVAD myocardium, on co-cultured fibroblasts. Our results demonstrated stimulated mast cells isolated from DCM tissue increased the  $^3\text{H}$ -proline incorporation in collagen and non-collagen proteins qualitatively similar. Non-stimulated mast cells did not induce  $^3\text{H}$ -proline incorporation over baseline. Interestingly, mast cells isolated from LVAD-supported myocardium

decreased the  $^3\text{H}$ -proline incorporation in collagen and non-collagen proteins below baseline. This *in vitro* experiment confirmed previous results from our group, that there is a change in mast-cell phenotype during LVAD support, reflecting an increase in chymase-negative mast cells. This shift in mast-cell distribution from chymase-positive to chymase-negative mast cells coincided with a decrease in collagen content and in bFGF in the myocardium [4]. We postulated that these changes in phenotypic expression in mast cells under long-term LVAD support might alter fibroblast function and cause a shift of the tissue steady state in a direction toward decreased extracellular matrix. However, the mechanism underlying the contribution of mast cells to ECM degradation is still not elucidated. There are several possibilities of mast-cell interaction:

Activated mast cells secrete mediators stimulating fibroblasts and endothelial cells to release ECM degrading proteases [5]. Mast-cell proteases could activate latent ECM degrading proteases, such as pro-MMP-3, pro-MMP-9, or pro-urokinase [6–8]. Chancey *et al.* reported *in vivo* activation of MMP-2 in the rat myocardium by stimulation of mast-cell degranulation and an accompanying degradation of extracellular matrix [9]. Finally, the mast-cell proteases could degrade the ECM directly [10]. Fajardo *et al.* have recently shown that tryptase, more precisely  $\beta$ -tryptase, is highly potent to degrade gelatin and also partially denatured collagen I, which would underline the direct degradation theory [11].

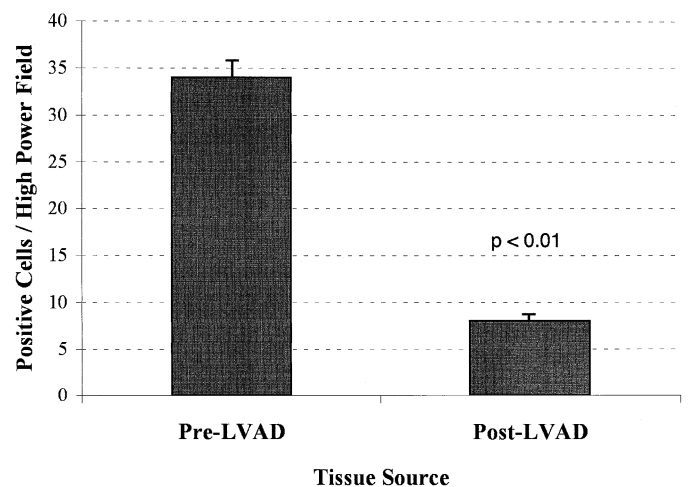
The results of our coculture system implicate a very close relationship between mast cells and fibroblasts. The fibroblast cultured only in fetal calf serum without mast cells showed a baseline protein production, which was further driven by activated mast cells isolated from (unsupported) DCM myocardium and slowed down by mast cells isolated from LVAD-supported myocardium. To elucidate this relationship, both cell types have to be characterized more precisely. Besides over 50 serine endopeptidases (most of them with trypsin- and/or chymotrypsin-like activities), lipid mediators, heparin, and histamine, mast cells can also produce cytokines and growth factors. Puxxedu *et al.* suggested in their review that the mast-cell cytokine and growth-factor content is dependent on the predominant-containing proteases, chymase and tryptase or tryptase only [12]. In light of this theory and observations of this and our previous study, the increase of tryptase- and chymase-positive mast cells in DCM is accompanied by an increase in mast cells with a particular cytokine/growth factor composition, which may stimulate fibroblasts to produce collagen and increase fibrosis. Considering chymase as a pro-fibrotic factor, possibly by conversion of angiotensin I to angiotensin II [13, 14], there would be at least two



**FIG. 2.** Staining for HSP-47 in DCM, LVAD-supported, and normal myocardium. (A) HSP-47 staining in DCM; (B) HSP-47 staining in DCM in higher magnification; (C) HSP-47 staining in LVAD-supported myocardium; (D) HSP-47 staining in normal myocardium.

different fibroses causing mechanisms, a direct and an indirect stimulation of fibroblasts.

Because this study is based on a cell-culture system and cells might behave differentially *in vitro* than they would *in vivo*, we also investigated HSP-47 expression in paraffin-fixed myocardium, a molecule known to be strongly associated with collagen production *in vivo*. HSP-47, that binds to pro-collagen molecules in the endoplasmic reticulum, dissociates from them in the *cis*-vesicles of the Golgi apparatus and acts as a molecular chaperone during processing and secretion of pro-collagen [3]. Takeda *et al.* have shown that expression of HSP-47 mRNA is concurrent with the expression of collagen mRNA of Types 1 and 3 [15]. After double staining for HSP-47 and vimentin, there were only a few positive cells per microscopy field in the normal myocardium, but we observed a tremendous increase in double-stained cells in DCM tissue (without previous LVAD support), implying a higher collagen production in fibroblasts. However, in the myocardium follow-



**FIG. 3.** Decrease in HSP-47-positive cells following LVAD support.



ing LVAD support, there were fewer HSP-47-positive cells per microscopy field, similar to normal myocardium. Net changes in myocardial matrix are due to changes in production rates in addition to changes in degradation rates.

### CONCLUSION

In our studies we observed the following:

A shift from chymase-positive mast cells in (unsupported) DCM to chymase-negative mast cells in LVAD supported myocardium.

A coinciding decrease in bFGF and collagen content in DCM myocardium following LVAD support.

A decrease of HSP-47-positive cells following LVAD support compared to pre-LVAD DCM myocardium.

An increase of protein production in fibroblasts co-cultured with mast cells isolated from DCM tissue, and a decrease of protein production below baseline in fibroblasts co-cultured with mast cells isolated from LVAD supported myocardium.

We suggest that during LVAD support there is either a phenotypic alteration of the myocardial mast cells or an immigration of mostly chymase-negative mast cells, which leads to a change in concentration and/or composition of mediators, capable of re-modeling the myocardial matrix.

### ACKNOWLEDGMENT

Dr. Skrabal is supported by a grant from the German Research Foundation (DFG, SK65/1-1).

### REFERENCES

1. Bruckner, B. A., Stetson, S. J., Perez-Verdia, A., Youker, K. A., Radovancevic, B., Connelly, J. H., Koerner, M. M., Entman, M. E., Frazier, O. H., Noon, G. P., and Torre-Amione, G. Regression of fibrosis and hypertrophy in failing myocardium following mechanical circulatory support. *J. Heart Lung Transplant.* **20**: 457, 2001.
2. Marone, G., de Crescenzo, G., Adt, M., Patella, V., Arbustini, E., and Genovese, A. Immunological characterization and functional importance of human heart mast cells. *Immunopharmacology* **31**: 1, 1995.
3. Satoh, M., Hirayoshi, K., Yokota, S., Hosokawa, N., and Nagata, K. Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J. Cell. Biol.* **133**: 469, 1996.
4. Akgul, A., Skrabal, C. A., Thompson, L. O., Loebe, M., Lafuente, J. A., Noon, G. P., and Youker, K. A. The role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support. *J. Heart Lung Transplant.* 2004. in press.
5. Metcalfe, D. D., Baram, D., and Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiol. Rev.* **77**: 1033, 1997.
6. Stack, M. S., and Johnson, D. A. Human mast cell tryptase activates single-chain urinary-type plasminogen activator (pro-urokinase). *J. Biol. Chem.* **269**: 9416, 1994.
7. Suzuki, K., Lees, M., Newlands, G. F., Nagase, H., and Woolley, D. E. Activation of precursors for matrix metalloproteinases 1 (interstitial collagenase) and 3 (stromelysin) by rat mast-cell proteinases I and II. *Biochem. J.* **305**(Pt. 1): 301, 1995.
8. Gruber, B. L., Marchese, M. J., Suzuki, K., Schwartz, L. B., Okada, Y., Nagase, H., and Ramamurthy, N. S. Synovial procollagenase activation by human mast cell tryptase dependence upon matrix metalloproteinase 3 activation. *J. Clin. Invest.* **84**: 1657, 1989.
9. Chancey, A. L., Brower, G. L., and Janicki, J. S. Cardiac mast cell-mediated activation of gelatinase and alteration of ventricular diastolic function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**: H2152, 2002.
10. Kielty, C. M., Lees, M., Shuttleworth, C. A., and Woolley, D. Catabolism of intact type VI collagen microfibrils: susceptibility to degradation by serine proteinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**: 1230, 1993.
11. Fajardo, I., and Pejler, G. Human mast cell beta-tryptase is a gelatinase. *J. Immunol.* **171**: 1493, 2003.
12. Puxeddu, I., Piliponsky, A. M., Bachelet, I., and Levi-Schaffer, F. Mast cells in allergy and beyond. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 1601, 2003.
13. Chandrasekharan, U. M., Sanker, S., Glynnias, M. J., Karnik, S. S., and Husain, A. Angiotensin II-forming activity in a reconstructed ancestral chymase. *Science* **271**: 502, 1996.
14. Caughey, G. H., Raymond, W. W., and Wolters, P. J. Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim. Biophys. Acta* **1480**: 245, 2000.
15. Takeda, K., Kusachi, S., Ohnishi, H., Nakahama, M., Murakami, M., Komatsubara, I., Oka, T., Doi, M., Ninomiya, Y., and Tsuji, T. Greater than normal expression of the collagen-binding stress protein heat-shock protein-47 in the infarct zone in rats after experimentally-induced myocardial infarction. *Coron. Artery Dis.* **11**: 57, 2000.

## **II. Selbständigkeitserklärung**

(gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock)

Ich erkläre,

- dass ich ein Verfahren zur Erlangung der Habilitation bisher an keiner wissenschaftlichen Einrichtung beantragt habe,
- dass vorliegende Habilitationsschrift bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde,
- dass die eingereichte Habilitationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Rostock, den 23.07.2007

---

(Dr. Christian Skrabal)

### III. Curriculum Vitae

<b>Name</b>	Dr. med. Christian Alfons Skrabal
<b>Geburtsdatum</b>	14.03.1969
<b>Geburtsort</b>	Regensburg
<b>Nationalität</b>	deutsch
<b>Familienstand</b>	verheiratet mit Misty Lynn Skrabal, geborene Gunderman Tochter: Anna Zoé

#### Beruflicher Werdegang und Ausbildung

31.03.2008	Erfolgreiche Verteidigung der Habilitationsschrift
seit 02/2007	Facharzt in der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. G. Steinhoff)
02/2007	Anerkennung als Facharzt für Herzchirurgie durch die Ärztekammer in Mecklenburg-Vorpommern
06/2004 – 02/2007	Assistenzarzt in der Klinik und Poliklinik für Herzchirurgie, Medizinische Fakultät der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. G. Steinhoff)
05/2002 – 05/2004	DFG-Forschungsstipendium als Postdoctoral Research Fellow am Michael E. DeBakey Department of Surgery, Division of Transplant Surgery and Assist Devices, Baylor College of Medicine, Houston, USA (Chair: Dr. George Noon)
05/1998 – 05/2002	Assistenzarzt in der Klinik für Herz-, Thorax- und herznahe Gefäßchirurgie, Klinikum der Universität Regensburg (Direktor: Prof. Dr. D. Birnbaum)
09/1998	Promotion an der Humboldt-Universität zu Berlin: Neue Untersuchungsmethoden zur Diagnose und Differentialdiagnose von zervikalen Lymphknotenvergrößerungen in der Computertomographie
12/1997	Erteilung der Approbation durch den Senat für Gesundheit und Soziales in Berlin
06/1996 – 11/1997	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Allgemeinchirurgie, Martin-Luther-Krankenhaus Berlin (Direktor: Prof. Dr. M. Harnoss)
04/1996	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote -gut-
03/1995 – 03/1996	Praktisches Jahr: Innere Medizin, Chirurgie, HNO
09/1989 – 03/1995	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin und Humboldt-Universität zu Berlin
10/1988 – 09/1989	Wehrdienst am II. Sanitätsbataillon/4, Regensburg
06/1988	Allgemeine Hochschulreife am Gymnasium Neutraubling, Bayern

## **IV. Danksagung**

Ich bedanke mich sehr herzlich bei meinen Lehrern und Mentoren Prof. Dr. Andreas Liebold, Prof. Dr. Gustav Steinhoff und Prof. Dr. Dietrich Birnbaum, die mich in der Ausbildung zum Herzchirurgen und Wissenschaftler jederzeit und in vollem Umfang unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Andreas Liebold für die zahlreichen Diskussionen und die konstruktiven Bemerkungen bei der Niederschrift der Habilitationsschrift.

Des Weiteren danke ich Dr. George Noon und Prof. Dr. Matthias Loebe, die mich während meines Forschungsaufenthaltes am Texas Medical Center mit ihrer Erfahrung und großen Menschlichkeit betreuten, und Dr. Keith Youker, der mich in sämtliche laborrelevante Analysetechniken einarbeitete.

Ich danke meinem Freund und Kollegen Dr. Larry Thompson für seine Kompetenz und Hilfsbereitschaft bei der Durchführung gemeinsamer Projekte.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Gewährung eines Forschungsstipendiums.

Und nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner lieben Frau Misty für ihre Geduld, ihr Verständnis und ihre Einzigartigkeit.